# annales de technologie agricole

SERVICE DE DOCUMENTATION
CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES - VERSAILLES

AMÉLIORATION des PLANTES
22 JUIN 1979
VERSAILLES

Trimestriel

1979

Vol. 28 - N° 1

inra

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

# INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle, 75007 PARIS, Tél. : 551-41-09.

---

Directeur général : J. POLY

---

***Annales agronomiques.***

— L. GACHON, Chef du Département d'Agronomie, 63100 Clermont-Ferrand.
— P. CHARTIER, Chef du Département de Bioclimatologie, C.N.R.A. Versailles.
— J. MAMY, Chef du Département de Science du Sol, C.N.R.A. Versailles.

***Annales de l'Amélioration des Plantes.***

— M. RIVES, Chef du Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes, I.N.R.A., 11, rue Jean-Nicot 75007 Paris.

***Annales de Phytopathologie.***

— A. COLENO, I.N.A. Paris Cedex 75231.

***Annales de Zoologie-Écologie animale.***

— B. HURPIN, Chef du Département de Recherches de Zoologie.

***Annales de Zootechnie.***

— A. RÉRAT, Chef du Département de Nutrition, C.N.R.Z.

***Annales de Technologie agricole.***

— P. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, 21034 Dijon Cedex.
— A. GUILBOT, Directeur de la Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés C.E.R.D.I.A., Le Noyer-Lambert, 91300 Massy.
— B. L. DUMONT, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Viande, C.N.R.Z.
— A. BOURDET, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I.N.R.A., 16, rue N.-Fortin, 75013 Paris.

***Annales des Sciences forestières.***

— P. BOUVAREL, Inspecteur général de la Recherche agronomique, Chef du Département de Recherches forestières, C.N.R.F.
— J. PARDÉ, Directeur de la Station de Sylviculture et de Production. C.N.R.F.

***Annales de Génétique et de Sélection animale.***

— P. MÉRAT, Directeur de la Station de Génétique factorielle. C.N.R.Z.
— B. VISSAC, Chef du Département de Génétique animale, C.N.R.Z.

***Apidologie*** (Revue franco-allemande, co-édition I.N.R.A.-Deutscher-Imkerbund).

— J. LOUVEAUX, Directeur de la Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, 91440 Bures-sur-Yvette.

***Annales de Recherches vétérinaires.***

— P. LARVOR, Directeur du Laboratoire des Maladies métaboliques, Theix, Saint-Genès-Champanelle 63110 Beaumont.

***Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique.***

C. THIBAULT, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A.
Administration et secrétariat de la Rédaction à l'adresse suivante : Secrétariat des A.B.A.B.B., C.N.R.Z., 78350 JOUY EN-JOSAS.

## ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION

Service des Publications de l'I.N.R.A.

# annales de technologie agricole

Trimestriel

1979

Vol. 28 - N° 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (1), 1-15.

# Adaptation de la méthode à l'orcinol-sulfurique au dosage automatique des glucides neutres totaux : conditions d'application aux extraits d'origine végétale

Marie-Thérèse TOLLIER et J.-P. ROBIN

*Laboratoire de Technologie Alimentaire, I.N.R.A. C.E.R.D.I.A. 91305 Massy*

## Résumé

L'orcinol ou 3,5 — dihydroxytoluène en milieu sulfurique est un réactif utilisé en biochimie pour analyser les glucides neutres présents dans un liquide biologique. La méthode colorimétrique mettant en œuvre un tel réactif, est depuis longtemps automatisée pour détecter et doser à 420 nm les glucides neutres effluant d'une colonne chromatographique. Malgré la grande sensibilité de cette méthode à 420 nm, son automatisation a rarement été tentée, en raison de sa faible spécificité à cette longueur d'onde, pour doser la totalité des glucides neutres contenus dans un extrait d'origine végétale. Une telle tentative est rapportée dans cette publication qui décrit le système d'automatisation et précise le domaine et les conditions d'utilisation de la méthode.

L'automatisation présentée peut convenir dans tous les cas où les échantillons ne contiennent pas une quantité trop importante de substances interférentes, telles que protéines, acides aminés à noyau aromatique, polyuronides... Elle est utilisable en particulier pour doser les glucides neutres totaux présents dans les produits amylacés.

Mots clés : *glucides totaux, orcinol, dosage automatique*

## Introduction

Le principe des méthodes classiques de dosage chimique des oses neutres varie selon qu'il s'agit des hexoses ou des pentoses (MONTREUIL et SPIK, 1963). Il est cependant, dans les deux cas, fondé sur la formation de produits de dégradation sous l'action des acides concentrés et chauds. Les composés obtenus ou dérivés furfuriliques (HAWORTH et JONES, 1944; IKAWA et NIEMANN, 1949), se condensent avec diverses substances tels les composés phénoliques, pour donner des complexes colorés de structure chimique encore mal définie. De nombreuses méthodes manuelles de dosage colorimétrique des oses et des osides générateurs de dérivés furfuriliques ont été décrites; elles diffèrent essentiellement par la nature

(1) Communication présentée aux Journées des Glucides, organisées par la Société Chimique de France et la Société de Chimie Biologique, à Villeneuve-d'Ascq, septembre 1974.

du réactif mis en œuvre : RIMINGTON (1940) emploie l'orcinol, DISCHE et SHETTLE (1948) le chlorhydrate de cystéine, DUBOIS *et al.* (1951) le phénol, DUNN et DRELL (1951) le thymol, LOEWUS (1952) et KOEHLER (1952) l'anthrone...

L'automatisation des méthodes de dosage colorimétrique des glucides a par ailleurs été envisagée soit pour détecter et doser les fractions glucidiques isomoléculaires contenues dans un effluent de colonne chromatographique, soit encore pour déterminer la quantité de glucides totaux ou de glucides réducteurs présents dans un extrait d'origine biologique. Dans de nombreux cas, les auteurs se sont intéressés aux glucides réducteurs et de ce fait, le principe du dosage retenu fait appel aux propriétés réductrices. Ainsi, dans les méthodes à l'hexacyanoferrate (SAMUELSON et SWENSON, 1963; FULLER, 1964; ROBYT *et al.*, 1972), au 2,4-dinitrophénolate (OBORN *et al.*, 1971), au bleu de tétrazolium (MOPPER et DEGENS 1972), à l'hydrazide de l'acide p-hydroxybenzoïque (MUNDIE *et al.*, 1976), seuls sont pris en compte les glucides porteurs d'un groupement semi-aldéhydique réducteur.

Certaines de ces méthodes ont cependant été adaptées à la détermination des glucides totaux : méthode à l'hexacyanoferrate après une hydrolyse chlorhydrique (PORTER et SAWYER, 1972); ou bien à celle des glucides dits « digestibles » : méthode à l'hydrazide de l'acide p-hydroxybenzoïque après hydrolyses enzymatiques (HUDSON *et al.*, 1976).

L'automatisation des méthodes mettant en œuvre les réactifs phénoliques en milieu acide a depuis longtemps été réalisée plus spécialement dans un but de détection et de dosage des glucides individuels présents dans les effluents de colonnes chromatographiques. Parmi ces méthodes, celle utilisant l'orcinol en milieu acide sulfurique concentré semble être de loin, la plus fréquente (ARWIDI et SAMUELSON, 1965; CATRAVAS, 1966; KESLER, 1967; LEE *et al.*, 1969). Par contre, l'automatisation de telles méthodes a plus rarement été tentée pour doser globalement les glucides contenus dans les produits biologiques : méthodes à l'α-naphtol (FULLER, 1964), au phénol (ROBYT et BEMIS, 1967), à l'orcinol (DEMAILLE *et al.*, 1965; SHANNON, 1972).

Nous décrivons dans la présente publication une tentative d'adaptation de la méthode colorimétrique à l'orcinol-sulfurique permettant, dans de nombreux cas et dans certaines conditions que nous précisons, la détermination quantitative globale et automatique des glucides neutres solubles présents dans un extrait d'origine végétale.

Cette méthode apparaît convenir tout particulièrement pour les extraits ou les échantillons issus des produits amylacés.

## Méthode proposée

### A. — *Principe*

Les liaisons glycosidiques des glucides neutres, libres ou conjugués, subissent, en présence d'acide sulfurique concentré et à chaud, une hydrolyse quantitative. Les unités osidiques ainsi libérées sont ensuite déshydratées en dérivés furfuriliques, produits qui se condensent avec l'orcinol (3,5-dihydroxytoluène) pour donner un complexe brun-orangé ayant une longueur d'onde d'absorption maximum se situant vers 420-425 nm.

## B. — *Réactifs*

— Acide sulfurique à 98 p. 100, $d = 1{,}83$ (Prolabo).

— Orcinol cristallisé pur (Merck), solubilisé à raison de 1 g/l d'acide sulfurique à 70 p. 100 (*v*/*v*). Ce réactif, maintenu à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire, est utilisable pendant plusieurs jours.

— Oses et oligosides purs (Merck).

## C. — *Appareillage*

L'appareil utilisé est un Autoanalyseur Technicon de première génération, comportant : un distributeur d'échantillon, une pompe proportionnante, un bain d'huile thermostaté à 98 °C, un colorimètre avec un jeu de filtres interférentiels de 420 nm.

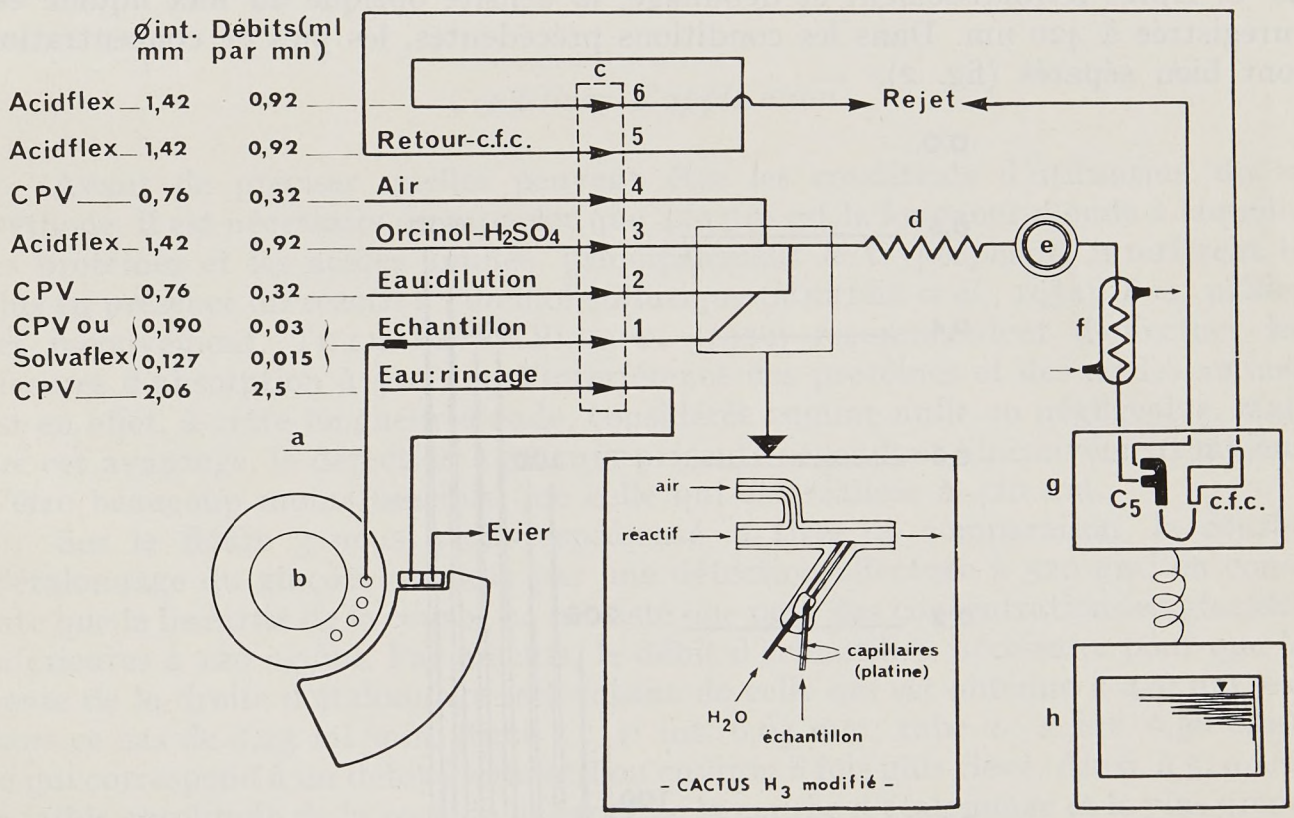



FIG. 1. — *Schéma de circulation du flux liquide et caractéristiques des tubes de pompage utilisés pour le dosage des glucides totaux par la méthode à l'orcinol-sulfurique.*

a : Capillaire de prélèvement (CPV ou téflon ∅ int. 0,30 mm).
b : Échantillonneuse avec came 10 — 1/3 (capacité : 40 godets).
c : Pompe proportionnante.
d : Double bobine de mélange.
e : Bain-marie à huile (98 °C) avec bobine de délai (12 m).
f : Bobine de réfrigération.
g : Colorimètre (ouverture n° 3, débulleur C5, cuve de 15 mm).
h : Enregistreur monocanal (vitesse de déroulement du papier : 5,8 cm/h).
CPV : chlorure de polyvinyle; c.f.c. : cellule à flux continu.

### D. — *Protocole opératoire*

Dans la méthode décrite, le choix de la combinaison de tubes assurant la régularité du bullage et du flux liquide continu a été guidé d'une part, par le souci de réduire la consommation d'acide sulfurique, d'autre part, par la nécessité de maintenir une cadence d'analyse minimum suffisante aux exigences de notre laboratoire (fig. 1).

Le distributeur d'échantillons muni d'une came 10-1/3 assure le pompage de 22,5 µl (tube 1 : ∅ int. 0,127 mm) ou de 45 µl (tube 1 : ∅ int. 0,190 mm) de chaque échantillon.

L'utilisation d'un tube capillaire pour le prélèvement de l'échantillon assure, compte tenu des faibles débits de prélèvement, l'incorporation d'une minibulle d'air entre chaque échantillon et l'eau de rinçage; le mélange prématuré de l'échantillon avec l'eau de rinçage est ainsi évité jusqu'au niveau du cactus $H_3$ modifié (encart de la fig. 1) assurant la dilution automatique continue de l'échantillon.

L'échantillon dilué 10 ou 20 fois selon le calibre du tube de pompage utilisé, est mis en présence du réactif préalablement segmenté par l'air. Après passage du flux réactionnel dans une bobine de mélange, le développement de la coloration est effectué par un séjour d'environ 25 min dans la bobine de délai portée à 98 °C. Après refroidissement et débullage, la densité optique du flux liquide est enregistrée à 420 nm. Dans les conditions précédentes, les pics de concentration sont bien séparés (fig. 2).

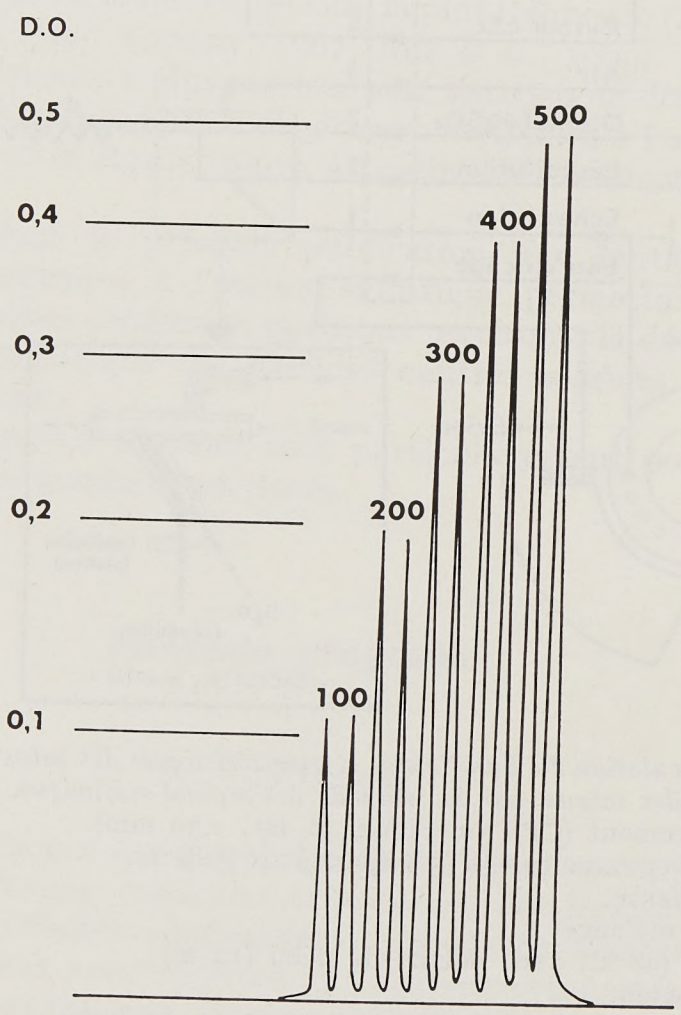



FIG. 2. — *Pics de concentration obtenus pour une gamme d'étalonnage de glucose. Concentrations en µg/ml.*

Pour chaque série de déterminations, une gamme d'étalonnage est nécessaire; la nature de l'ose, de l'oligoside ou du mélange de différents oses utilisés pour réaliser celle-ci, dépend de la nature des glucides contenus dans les produits à analyser. Elle est réalisée en milieu aqueux pur ou contenant une certaine proportion d'un solvant polaire d'extraction (solutions eau-éthanol) ou de « dispersion » des glucides (solutions eau-diméthylsulfoxyde). A partir de cette solution standard, des dilutions sont effectuées de façon à obtenir des concentrations comprises entre 0 et 500 µg/ml (tube 1 : ∅ int. 0,127 mm) ou entre 0 et 250 µg/ml (tube 1 : ∅ int. 0,190 mm).

## Résultats et discussion

### *Courbes d'étalonnage*

La figure 3 représente, à 420 nm, un exemple de courbe d'étalonnage obtenue avec une solution aqueuse de glucose. A cette longueur d'onde et avec un débit nominal de 0,015 ml/min (fig. 1, tube 1 : ∅ int. 0,127 mm), la loi de BEER-LAMBERT est vérifiée pour des concentrations en glucides allant jusqu'à 500 µg/ml.

### *Conditions d'application*

Avant de préciser quelles peuvent être les conditions d'utilisation de la méthode, il est nécessaire de rappeler que 420 nm est la longueur d'onde à laquelle les protéines et les acides aminés, principalement le tryptophane, interfèrent le plus en présence du réactif à l'orcinol-sulfurique (MENDEL *et al.*, 1954). Pour pallier cet inconvénient, TILLMANS et PHILIPPI (1929) recommandent d'effectuer les mesures d'absorption à 510 nm; l'interférence des protéines et des acides aminés est en effet, à cette longueur d'onde, considérée comme nulle ou négligeable. Malgré cet avantage, la détection à 510 nm présente cependant l'inconvénient majeur d'être beaucoup moins sensible que celle qui est réalisée à 420 nm.

Sur la figure 3 nous avons représenté, à titre de comparaison, la courbe d'étalonnage du glucose obtenue par une détection effectuée à 520 nm; on constate que la linéarité de la courbe ne subsiste que pour des concentrations en glucides inférieures à 120 µg/ml. Par ailleurs, le débit d'échantillon nécessaire pour que la pente de la droite d'étalonnage soit voisine de celle qui est obtenue à 420 nm, est dans ce cas de 0,23 ml/min. (tube 1 : ∅ int. 0,63 mm; tube 2 : ∅ int. 0,38 mm), ce qui correspond à un débit d'échantillon environ 8 fois plus élevé. Ainsi, à 520 nm, la faible amplitude de la zone de linéarité de la courbe d'étalonnage et le plus grand volume d'échantillon nécessaire, montrent bien qu'à cette longueur d'onde, très éloignée du maximum d'absorption (fig. 4), la sensibilité est fortement diminuée.

Pour pleinement bénéficier de la bonne sensibilité à 420 nm de la méthode à l'orcinol-sulfurique, il est donc souhaitable de connaître au préalable l'ordre de grandeur de la quantité de substances protidiques en solution dans les extraits à analyser. Si cette quantité, exprimée en azote et rapportée à la quantité de glucides, est supérieure à 15 p. 100 (teneur exceptionnelle dans le cas des extraits végétaux), une purification doit être effectuée : cette dernière peut être réalisée soit par défécation classique (par exemple à l'aide du réactif au ferrocyanure de zinc), soit par

résine échangeuse d'ions (MONTREUIL *et al.*, 1965). Dans le cas où la purification serait difficile voire impossible, les mesures d'absorption, pour des solutions dont la concentration en glucides est inférieure à 100 µg/ml, peuvent être néanmoins effectuées à 510 ou 520 nm, en utilisant pour le pompage de l'échantillon un tube de calibre supérieur (⌀ int. 0,63 mm).

Une seconde cause d'erreur importante peut provenir de la présence d'acides uroniques ou de polyuronides dans la solution à doser. On sait en effet, que ceux-ci réagissent avec l'orcinol-sulfurique pour donner une absorption non négligeable à 420 nm. Ce fait a d'ailleurs été mis à profit par certains auteurs pour détecter ou doser les acides uroniques (KHYM et DOHERTY, 1952; FRANSSON *et al.*, 1968). Il est donc nécessaire dans le cas où la solution contiendrait à la fois des glucides neutres et des acides uroniques ou des polyuronides, d'éliminer ces derniers par fixation sur une colonne échangeuse d'anions (MONTREUIL et SPIK, 1967) ou bien d'appliquer une formule corrective, telle que celle proposée par SPIK et MONTREUIL (1964), qui tient compte du résultat du dosage des acides uroniques par la méthode au carbazol-sulfurique (MC COMB et MC CREADY, 1952).

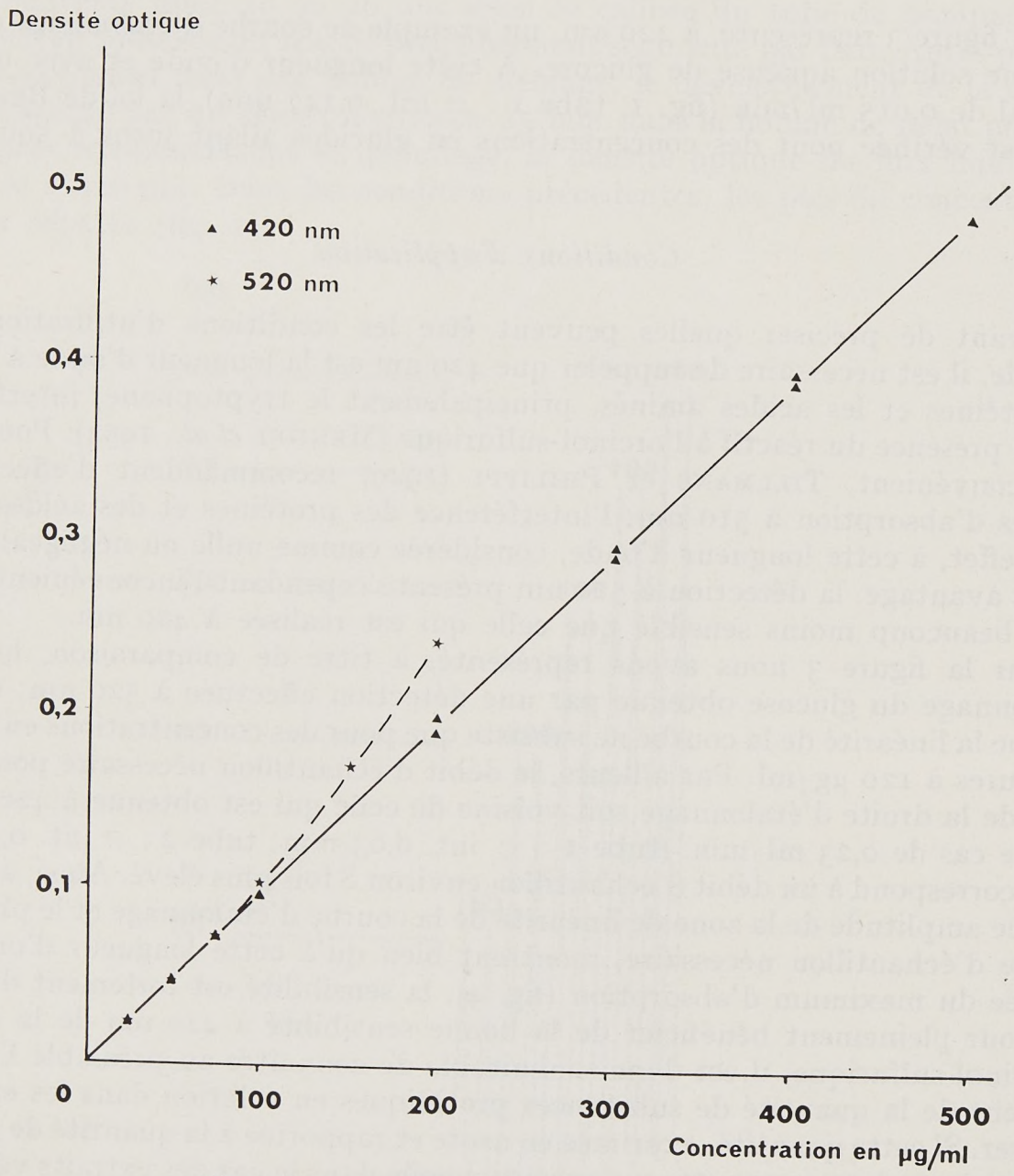



FIG. 3. — *Courbes d'étalonnage du glucose.*
*Comparaison entre les courbes obtenues à 420 nm (tube CPV, ⌀ int. 0,127 mm) et à 520 nm (tube CPV, ⌀ int. 0,63 mm).*

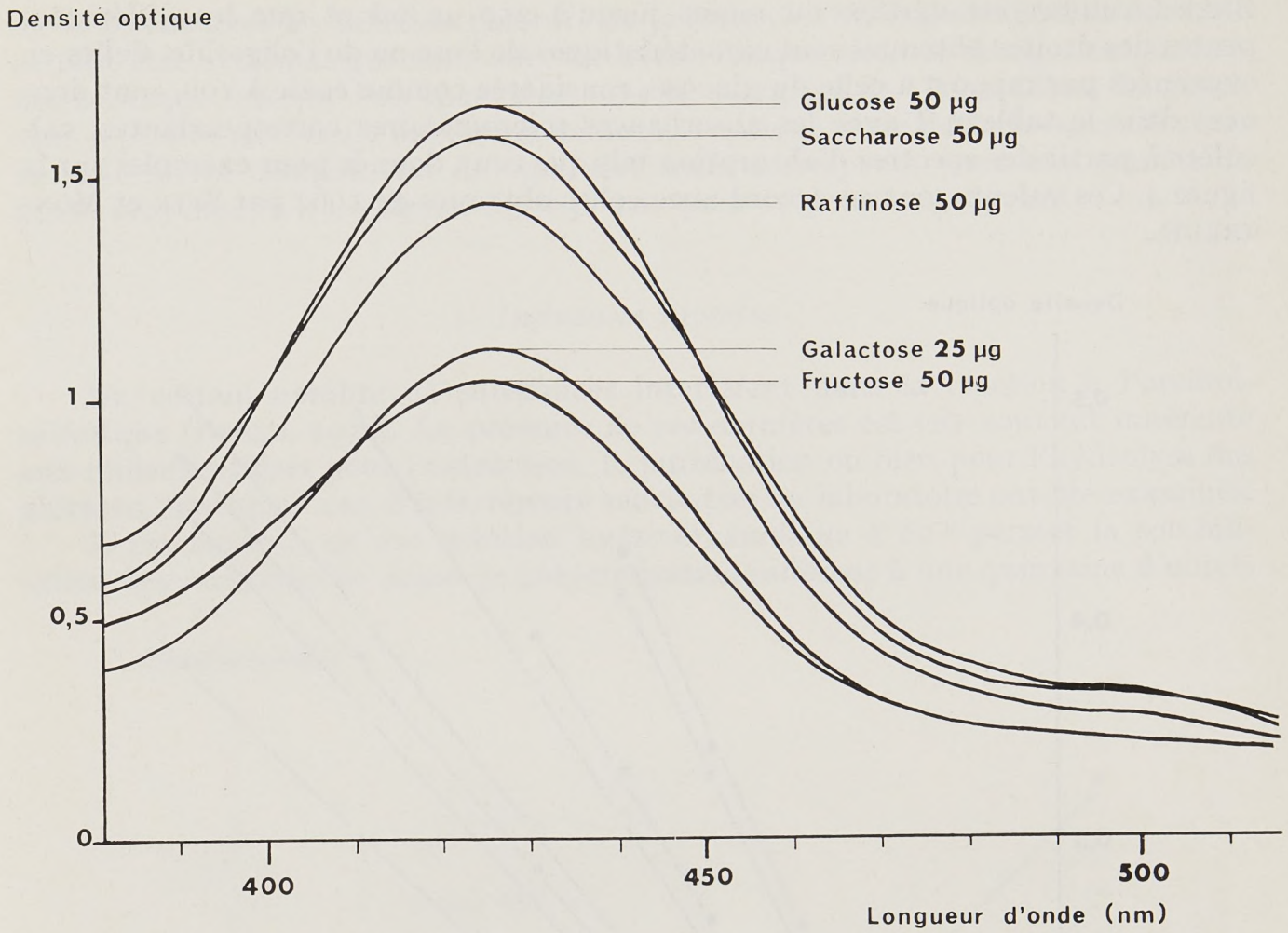



FIG. 4. — *Spectres d'absorption, entre 380 et 510 nm, des complexes colorés obtenus dans les conditions de la méthode entre l'orcinol en milieu acide sulfurique et divers oses et oligosides.*

TABLEAU I

*Absorbances micromolaires et relatives (rapportées, pour la même masse, à celle du glucose considérée comme égale à 100) des colorations, obtenues à 420 nm, pour divers oses et oligosides avec le réactif à l'orcinol-sulfurique, dans les conditions de la méthode*

| | ABSORBANCES MICROMOLAIRES | ABSORBANCES RELATIVES |
|---|---|---|
| Glucose | 6,6 | 100 |
| Fructose | 5,4 | 76 |
| Xylose | 10,2 | 164 |
| Galactose | 8,1 | 132 |
| Arabinose | 10,0 | 173 |
| Saccharose | 11,0 | 90 |
| Raffinose | 18,5 | 95 |
| Stachyose | 28,1 | 126 |

La figure 5 représente les courbes d'étalonnage de solutions aqueuses de fructose, xylose, galactose, saccharose, raffinose et stachyose, comparées à la courbe d'étalonnage relative au glucose. On constate dans tous les cas, que la loi de

BEER-LAMBERT est vérifiée au moins jusqu'à 250 µg/ml et que les différentes pentes des droites obtenues sont caractéristiques de l'ose ou de l'oligoside. Celles-ci, exprimées par rapport à celle du glucose, considérée comme égale à 100, sont données dans le tableau I avec les absorbances micromolaires correspondantes, calculées à partir des spectres d'absorption tels que ceux donnés pour exemples sur la figure 4. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues en 1964 par SPIK et MONTREUIL.

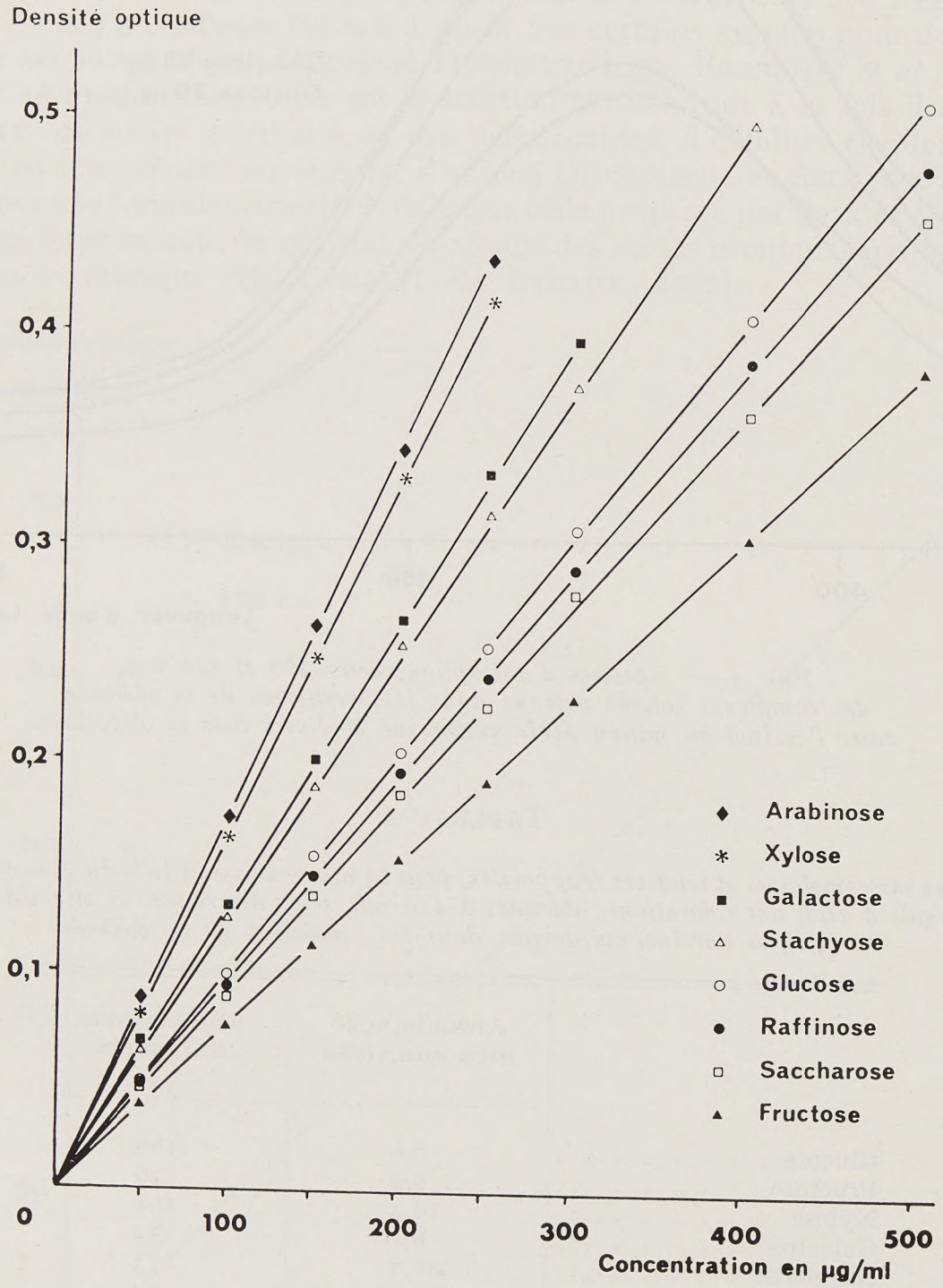



FIG. 5. — *Courbes d'étalonnage de différents oses et oligosides.*

*Reproductibilité et précision*

La reproductibilité que l'on peut exprimer par l'écart maximum par rapport à la valeur moyenne, entre les pentes des droites d'étalonnage obtenues après renouvellement des solutions étalons, des réactifs et des tubes de pompage, est de l'ordre

de 10 p. 100 avec les tubes en chlorure de polyvinyle. Un étalonnage doit donc, de ce fait, être systématiquement effectué avant chaque série de dosage, en particulier à chaque fois que l'on change de tube de pompage de l'échantillon. La précision exprimée par l'écart maximum de densité optique entre deux dosages effectués sur une même dilution, est de 0,01. Cet écart correspond, pour une gamme de pente moyenne, à ± 5 µg/ml (± 1 p. 100 pour le point 500 µg/ml).

*Influences diverses*

Un certain nombre de substances interfèrent dans la réaction à l'orcinol-sulfurique (Besle, 1974). La présence de ces dernières est très souvent inhérente aux milieux utilisés pour l'extraction, la purification ou bien pour l'hydrolyse des glucides. Quelques cas d'interférence rencontrés au laboratoire ont été examinés.

Il est reconnu qu'une solution hydro-éthanolique à 80 ° permet la solubilisation des molécules de degré de polymérisation inférieur à une quinzaine d'unités

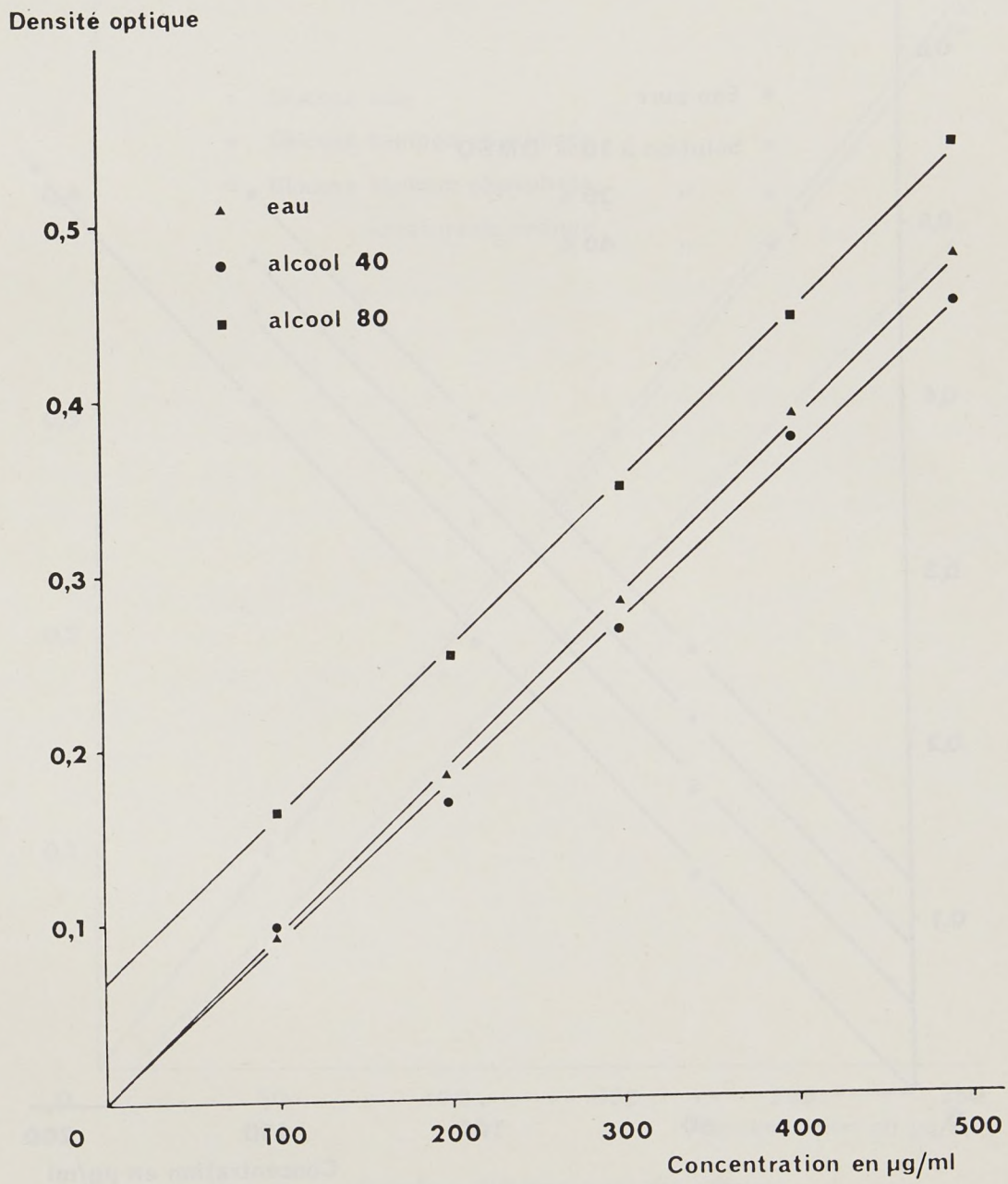



Fig. 6. — *Courbes d'étalonnage du glucose. Influence du degré éthanolique.*

osidiques. Un tel titre alcoolique est généralement retenu au laboratoire pour extraire et purifier les oses et oligosides contenus dans un extrait végétal. Pour cette raison, il nous a paru intéressant de chercher à effectuer les dosages directement sur des extraits éthanoliques. On a constaté que la linéarité, entre 0 et 500 µg/ml, subsistait quel que soit le titre alcoolique des dilutions réalisées à partir de la solution utilisée pour l'extraction (éthanol 80°). Jusqu'à un titre alcoolique de 43-44° (extraits dilués une fois), les droites d'étalonnage sont très voisines de celle obtenue pour le glucose en milieu aqueux pur; par contre, au-delà de ce titre, les droites ne passent plus par l'origine, l'absorbance donnée par l'éthanol avec le réactif devenant non négligeable (fig. 6).

Des solvants polaires sont souvent employés pour solubiliser les agrégats ou les structures cohésives souvent rencontrés chez les polyholosides. Dans le cas du diméthylsulfoxyde (DMSO), solvant largement utilisé pour rompre les liaisons hydrogène responsables de l'insolubilité des glucides de forte masse moléculaire,

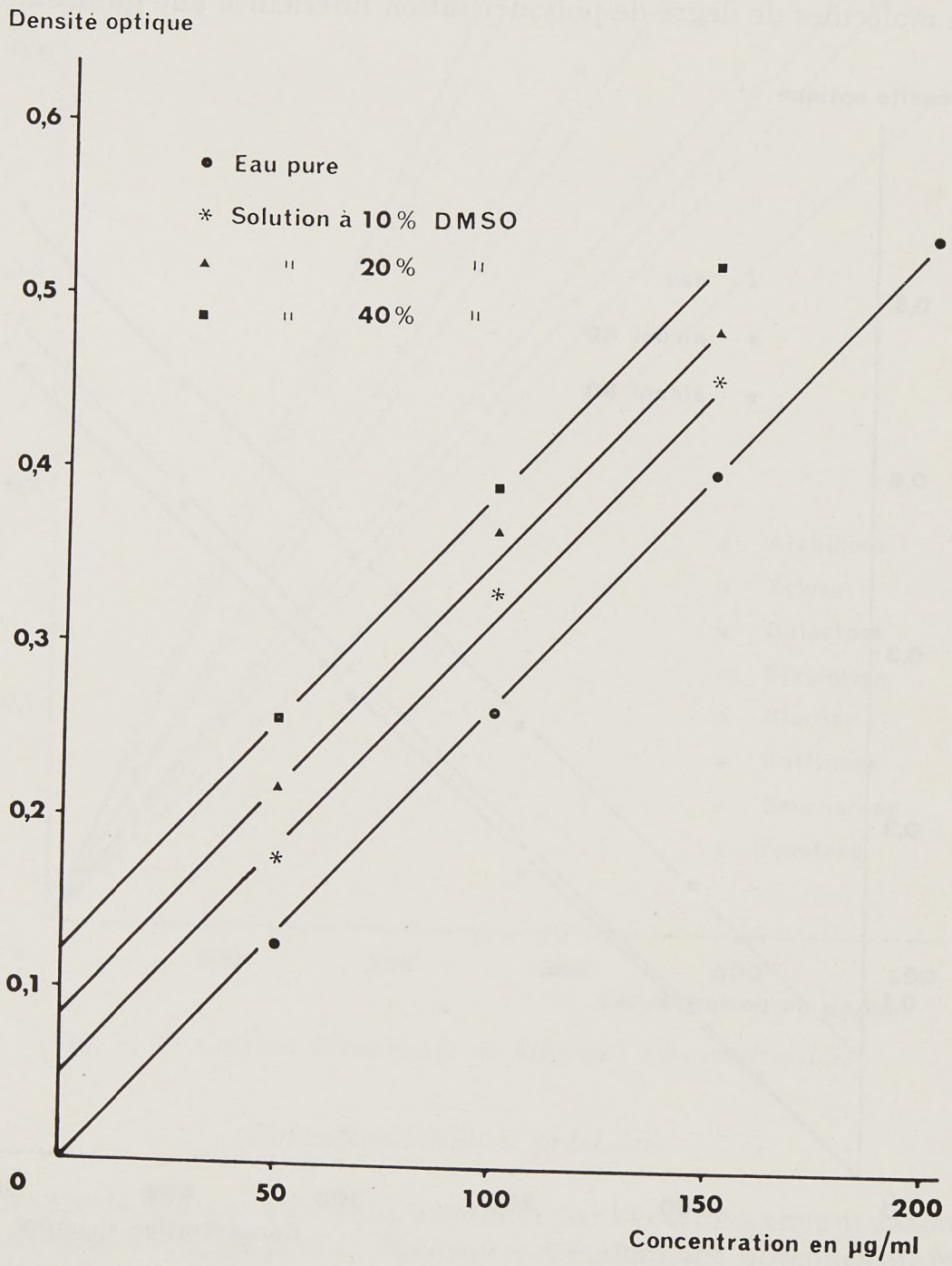



FIG. 7. — *Courbes d'étalonnage du glucose. Influence de la concentration en diméthy sulfoxyde.*

la méthode proposée peut également être utilisée, comme dans le cas des solutions hydro-alcooliques. Dans ce cas, la linéarité des courbes d'étalonnage, courbes qui par ailleurs, ne passent plus par l'origine dès les premiers pour 100 de DMSO, n'est vérifiée que pour des concentrations n'excédant pas 200 µg/ml (fig. 7).

La précision obtenue en milieu hydro-alcoolique ou en milieu eau-DMSO est identique à celle indiquée dans le cas du glucose en solution aqueuse. On a remarqué cependant qu'avec les tubes en « Solvaflex », utilisés pour le pompage des solvants, les débits étaient moins reproductibles que ceux obtenus avec leurs homologues en chlorure de polyvinyle. La variabilité de débit ainsi observée, explique que l'on ait obtenu dans les deux cas précédents, des courbes d'étalonnage de plus faible reproductibilité.

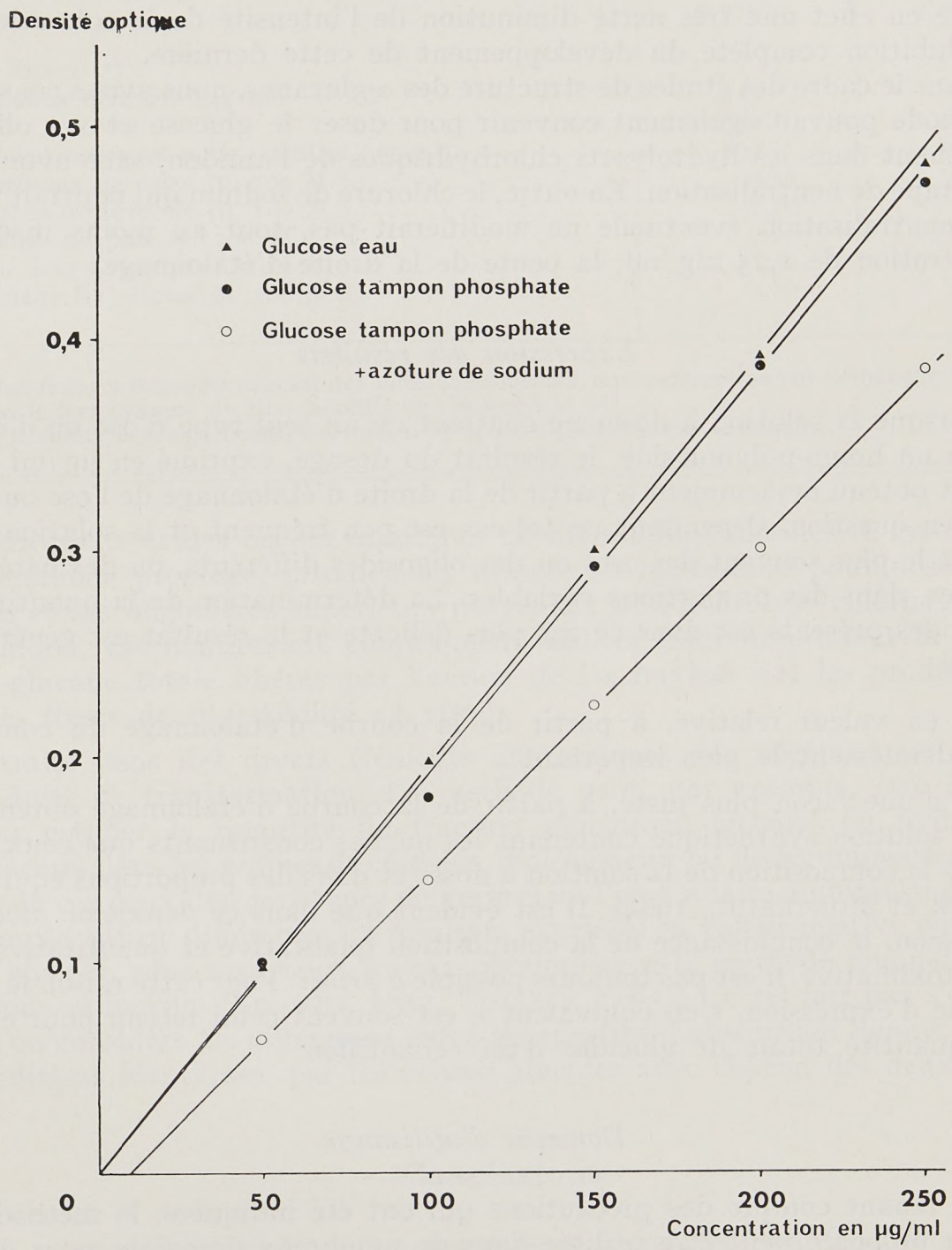



FIG. 8. — *Courbes d'étalonnage du glucose.*
*Influence du tampon phosphate 0,01 M et de 0,02 p. 100 d'azoture de sodium.*

Lors de l'étude de la structure des polyholosides par les enzymes glycolytiques spécifiques et purifiées, les glucides libérés se trouvent généralement en milieu aqueux tamponné contenant souvent un agent antimicrobien. Dans le cas des α-glucanes, tel que l'amidon par exemple, nous avons été amenés au laboratoire à doser le glucose et ses oligomères d'ordre supérieur, libérés sous l'action des enzymes amylolytiques, dans un tampon phosphate 0,01 M, additionné d'un antiseptique, l'azoture de sodium ($NaN_3$), à raison de 0,02 p. 100 (en p/v). Des gammes d'étalonnage relatives au glucose en milieu tampon, avec ou sans azoture de sodium, ont donc été établies. La comparaison de celles-ci avec celle relative au glucose en milieu aqueux (fig. 8), nous permet de constater que le tampon phosphate 0,01 M ne modifie pas sensiblement les droites d'étalonnage; on remarque par contre, que l'addition de l'antiseptique provoque une diminution de la pente de la droite, celle-ci ne passe plus par l'origine. L'addition d'azoture de sodium entraîne en effet une très nette diminution de l'intensité de la coloration, voire une inhibition complète du développement de cette dernière.

Dans le cadre des études de structure des α-glucanes, nous avons constaté que la méthode pouvait également convenir pour doser le glucose et ses oligomères directement dans les hydrolysats chlorhydriques de l'amidon, sans avoir recours à une étape de neutralisation. En outre, le chlorure de sodium qui pourrait provenir d'une neutralisation éventuelle ne modifierait pas, tout au moins jusqu'à une concentration de 1,25 mg/ml, la pente de la droite d'étalonnage.

### *Expression des résultats*

Lorsque la solution à doser ne contient qu'un seul type d'ose ou d'oligoside ou bien un homo-polyholoside, le résultat du dosage, exprimé en µg/ml de solution, est obtenu évidemment à partir de la droite d'étalonnage de l'ose ou de l'oligoside en question. Cependant un tel cas est peu fréquent et la solution à doser contient le plus souvent des oses ou des oligosides différents, ou des hétéro-polyholosides, dans des proportions variables. La détermination de la quantité totale de glucides présents est dans ce cas plus délicate et le résultat est généralement exprimé :

— soit en valeur relative, à partir de la courbe d'étalonnage du constituant pondéralement le plus important;

— soit d'une façon plus juste, à partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec une solution synthétique contenant les mêmes constituants que ceux entrant dans la composition de la solution à doser et dans des proportions équivalentes (Spik et Montreuil, 1964). Il est évident que dans ce deuxième mode d'expression, la connaissance de la composition qualitative et quantitative, même approximative, n'est pas toujours possible *a priori*. Pour cette raison le premier mode d'expression, « en équivalent », est souvent celui retenu pour exprimer la quantité totale de glucides d'un échantillon.

### *Domaine d'utilisation*

En tenant compte des précautions qui ont été indiquées, la méthode automatique proposée peut être utilisée dans de nombreux domaines pour doser les glucides neutres totaux présents dans une solution aqueuse issue d'organes végétaux. En particulier, elle peut être utilisée dans les cas qui suivent (tabl. 2) :

TABLEAU 2

*Exemples de cas d'utilisation de la méthode automatique à l'orcinol-sulfurique*
(Les résultats exprimés en glucose, sont comparés avec ceux obtenus par la méthode manuelle à l'anthrone-sulfurique)

| | MÉTHODE A L'ORCINOL | MÉTHODE A L'ANTHRONE |
|---|---|---|
| Hydrolysats acides d'amidon (µg/ml) | 720 | 720 |
| | 925 | 937 |
| Hydrolysats enzymatiques (α-amylase) de grains maïs (µg/ml) | 225 | 225 |
| | 1 070 | 1 075 |
| *Extraits divers* (*) : | | |
| Contenus digestifs (µg/ml) | 325 | 290 |
| | 750 | 685 |
| Aliment composé pour volailles (µg/ml) | 890 | 945 |
| Tourteaux de colza (p. 100 M.S.) | 9,50 | 8,40 |
| Graines de féverole (p. 100 M.S.) | 8,10 | 7,40 |
| Graines de pois (p. 100 M.S.) | 9,10 | 7,40 |
| Foin Ray-Grass (p. 100 M.S.) | 11,50 | 11,60 |
| Ensilage Ray-Grass (p. 100 M.S.) | 4,80 | (**) |

(*) Les dosages sont effectués sur des solutions aqueuses, après extraction par l'éthanol à 80° et défécation par le ferrocyanure de zinc (réactifs de CARREZ I et II).
(**) Résultat non significatif, coloration et spectre d'absorption anormaux.

— Hydrolysats acides ou enzymatiques de divers polyholosides. C'est ainsi que la méthode proposée, initialement utilisée au laboratoire pour doser le glucose et ses oligomères supérieurs provenant de l'hydrolyse chlorhydrique de l'amidon, est maintenant couramment utilisée pour déterminer la quantité d'α-glucane totale libérée par l'action de l'α-amylase sur les produits amylacés (tests de digestibilité *in vitro*).

— Extraits issus des divers éléments anatomiques des végétaux ou de leurs produits de transformation. La méthode peut, par exemple, être employée pour estimer la quantité de fraction glucidique alcoolo- ou hydrosoluble contenue dans les graines de céréales, d'oléagineux ou de légumineuses; dans le cas de ces deux derniers types de graines où l'on a affaire à un mélange de glucides de nature différente, les résultats exprimés en valeur relative par rapport au glucose, sont supérieurs à ceux obtenus avec la méthode manuelle à l'anthrone-sulfurique (LEOWUS, 1952; TOLLIER, 1965). Un tel fait peu s'expliquer si l'on considère les différences entre les spectres d'absorption donnés dans des conditions identiques, par les mêmes glucides avec chacun des deux réactifs.

## Conclusions

La méthode automatique proposée peut remplacer avantageusement dans beaucoup de cas, particulièrement dans celui des produits amylacés, la méthode manuelle à l'anthrone-sulfurique ou les autres méthodes colorimétriques basées

sur le même principe. Cependant, son application à l'étude de la composition glucidique globale d'un liquide biologique doit tenir compte, du fait de sa faible spécificité à 420 nm, de la présence éventuelle de substances telles que protides ou acides uroniques. Lorsque de tels composés sont présents, en quantité notable, une purification préalable des extraits est obligatoire.

La cadence (10 échantillons par heure), la sensibilité et la précision des dosages (à ± 1 p. 100 près) sont suffisantes pour les analyses de routine d'un laboratoire. La dilution automatique et la grande amplitude de la zone de linéarité des courbes d'étalonnage (0 — 500 µg/ml) évitent par ailleurs, une dilution préalable trop importante des échantillons. Le volume d'échantillon nécessaire est très faible (inférieur à 45 µl) et, la consommation en acide sulfurique (40 ml/h d'acide concentré) est inférieure à celle généralement utilisée dans les autres méthodes automatiques de dosages ou de détection des glucides utilisant des réactifs phénoliques en milieu acide.

*Reçu pour publication en décembre 1978.*

## Summary

*Adaptation of the orcinol-sulphuric acid method for the automatic titration of total neutral sugars: conditions of application to plant extracts*

The reaction of carbohydrates with orcinol or 3,5-dihydroxytoluol in strong sulphuric acid has been widely used for analysis of sugars in various biological fluids. An arrangement of orcinol method automation is described for total titration of neutral sugars contained in plant extracts. This automatic method permits hourly the determination of 10 samples with a small consumption of acid and requires less than 45 µl of sample. Availability of the method and its accuracy are defined.

## Références bibliographiques

ARWIDI B., SAMUELSON O., 1965. Partition chromatography of sugars on ion-exchange resins. *Svensk. Kem. Tidskr.*, **77**, 84-90.

BESLE J. M., 1974. Séparation des oses, des di- et triholosides par chromatographie d'échange d'ions. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **14**, 545-573.

CATRAVAS G. N., 1966. New development in automatic sugar chromatography. Technicon International Symposium, Paris. *In* « Automation in Analytical Chemistry », vol. 1, Mediad Inc., White Plains, N. Y., 1967, **82**.

DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R., BISERTE G., 1965. Isolement, propriétés physicochimiques et composition de l'$\alpha_2$-macro-globuline de porc. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 3506-3511.

DISCHE Z., SHETTLE L. B., 1948. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.*, **175**, 595-603.

DUBOIS, M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A., SMITH F., 1965. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.

DUNN M. S., DRELL W., 1951. Experiments in Biochemistry. Mc GRAW-HILL, New-York, 71.

FRANSSON L. A., RODEN L., SPACH M. L., 1968. Automated ion-exchange chromatography of uronic acids and uronic acid-containing oligosaccharides. *Anal. Biochem.*, **23**, 317-330.

FULLER K. W., 1964. Determination of carbohydrates. Technicon International Symposium, London. *In* « Automation in Analytical Chemistry », vol. 2, Mediad Inc., White Plains, N. Y., 1965, 78.

HAWORTH W. N., JONES W. G. M., 1944. The conversion of sucrose into furan compounds. I — 5-Hydroxyméthylfurfuraldehyde and some derivatives. *J. Chem., Soc.*, 667-670.

HUDSON G. J., JOHN P. M. V., BAILEY B. S., SOUTHGATE D. A. T., 1976. The automated determination of carbohydrate. Development of a method for available carbohydrates and its application to foodstuffs. *J. Sci. Fd. Agric.*, **27**, 681-687.

IKAWA M., NIEMANN C., 1949. A spectrophotometric study of the behavior of carbohydrates in 79 p. 100 sulfuric acid. *J. Biol. Chem.*, **180**, 923-931.

KESLER R. B., 1967. Rapid quantitative anion-exchange chromatography of carbohydrates. *Anal. Chem.*, **39**, 1416-1422.

KHYM J. X., DOHERTY D. G., 1952. The analysis and separation of glucoronic and galacturonic acids by ion exchange. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 3199-3200.

KOEHLER L. H., 1952. Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction. Rate and color intensity. *Anal. Chem.*, **24**, 1576-1579.

LEE Y. C., MCKELVY J. F., LANG D., 1969. Rapid automatic analysis of sugar components of glycoproteins. II. — Neutral sugars. *Anal. Biochem.*, **24**, 128-131.

LŒWUS F. A., 1952. Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. *Anal. Chem.*, **17**, 371.

MC COMB E. A., MC CREADY R. M., 1952. Colorimetric détermination of pectic substances. *Anal.Chem.*, **24**, 1630-1632.

MENDEL B., KEMP A., MYERS D. K., 1954. A colorimetric micromethod for the determination of glucose. *Biochem. J.*, **56**, 639-646.

MONTREUIL J., SCHEPPLER N., 1959. Chromatographie quantitative des oses constituants des glycoprotéides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **41**, 13-28.

MONTREUIL J., SPIK G., 1963. Microdosage des glucides. Fascicule 1. Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Monographies du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille.

MONTREUIL J., SPIK G., DUMAISNIL J., MONSIGNY M., 1965. Procédés de détermination de la composition en oses des osides libres et combinés. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 239-254.

MONTREUIL J., SPIK G., KONARSKA A., 1967. Microdosage des glucides. Fascicule 3. Méthodes chromatographiques de dosage des oses « neutres ». Monographies du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille.

MOPPER K., DEGENS E. T. 1972. A new chromatographic sugar autoanalyzer with a sensitivity of $10^{-10}$ moles. *Anal. Biochem.*, **45**, 147-153.

MUNDIE C. M., CHESHIRE M. V., ANDERSON H. A., INKSON R. H. E., 1976. Automated determination of monosaccharides using p-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Anal. Biochem.*, **71**, 604-607.

OBORN R. E., LIBBY R. A., ERNST J. M., HENDERSON J. C., 1971. Automated determination of reducing sugar and sucrose in food products. *Cereal Chem.*, **48**, 270-275.

PORTER D. G., SAWYER R., 1972. The automatic determination of sugars in foodstuffs by a continuous flow technique with a redox detector. *Analyst.*, **97**, 569-575.

RIMINGTON C., 1940. Seromucoid and the bound carbohydrate of the serum proteins. *Biochem. J.*, **34**, 931-939.

ROBYT J. F., BEMIS S., 1967. Use of the autoanalyzer for determining the blue value of the amylose-iodine complex and total carbohydrate by phenol-sulfuric acid. *Anal. Biochem.* **19**, 56-60.

ROBYT J. F., ACKERMAN R. J., KENG J. G., 1972. Reducing value methods for maltodextrins. II. — Automated methods and chain length independance of alkaline ferricyanide. *Anal. Biochem.*, **45**, 517-524.

SAMUELSON O., SWENSON B. Z., 1963. Partition chromatography on ion exchange resins. Separation of sugars. *Anal. Chim. Acta.*, **28**, 426-432.

SHANNON D. W. F., 1972. A semi-automated method for the determination of the available carbohydrate content of poultry feeds. *Analyst.*, **97**, 209-212.

SPIK G., MONTREUIL J., 1964. Deux causes d'erreur dans les dosages colorimétriques des oses neutres totaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **46**, 739-749.

TILLMANS J., PHILIPPI K., 1929. Uber den Gehalt der wichtigsten Proteine der Nahrungsmittel an Kolhlenhydrat und über ein kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von stickstoffreiem Zucher in Eiweis. *Biochem. Z.*, **215**, 36-60.

TOLLIER M. T., 1965. Contribution à l'étude de l'action du rayonnement gamma sur les caractères physico-chimiques de l'amidon et sa sensibilité aux amylases. Thèse d'Ingénieur, Cons. Nat. des Arts et Métiers, Paris.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (1), 17-30.

# Evolution des constituants volatils au cours du stockage du jus de tomate. Rôle de l'acide ascorbique et des pigments carotenoïdes

Y. COULIBALY, S. SECK et J. CROUZET

*Laboratoire de Biochimie Appliquée,*
*Université des Sciences et Techniques du Languedoc,*
*34060 Montpellier Cédex*

## Résumé

Au cours de la conservation des jus de tomate en boîte métallique vernissée, à des températures de 30 et 37 °C pendant des périodes variant de 3 à 12 mois, on observe une augmentation de la teneur en composés carbonylés : principalement du furfural et autres composés furaniques, de la méthyl-6 heptène-5 one-2 et du benzaldéhyde. On note également une augmentation du pourcentage relatif de l'α terpinéol alors que pour le phényl éthanol et l'alcool benzylique on observe une diminution. L'apparition du furfural apparaît liée à la dégradation de l'acide ascorbique au cours d'un processus non oxydatif qui suit une cinétique du premier ordre. Un phénomène identique semble être responsable de la formation de la méthyl-6 heptène-5 one-2 à partir des caroténoïdes.

Mots clés : *tomate, stockage, composés volatils, composés carbonylés, acide ascorbique, caroténoïdes.*

## Introduction

L'effet des traitements thermiques sur la nature des composés volatils des jus de tomate a fait l'objet d'un certain nombre de travaux. On trouvera dans les articles de SECK, CROUZET et PIVA (1976) et SIESO et CROUZET (1977) une revue des recherches antérieures.

Par contre, les études relatives à l'influence du stockage sur les composés volatils sont beaucoup plus limitées. Dans la plupart des cas, les auteurs se sont intéressés à la dégradation de l'acide ascorbique, à la destruction des pigments ou au brunissement non enzymatique, en fonction de la durée et de la température de conservation (LUH, LEONARD et MARSH (1958), HUMMEL et OKEY (1950). A notre

connaissance, seuls, NELSON et HOFF (1969) ont étudié les modifications intervenant au niveau des composés volatils au cours du stockage. Ces auteurs ne signalent que de faibles modifications après une durée de stockage de 8 mois à température ambiante. Ils notent, d'une façon générale, une décroissance de la concentration en alcools et, pour certaines variétés, une augmentation de la teneur en sulfure de méthyle. Certains des composés volatils mis en évidence dans les produits dérivés de la tomate (SECK, CROUZET et PIVA, 1976) ou dans des jus de tomate chauffés (SIESO et CROUZET, 1977) : dérivés du furane (furfural, acétyl-2 furane, méthyl-5 furfural, alcool furfurylique) ou méthyl-6 heptène-5 one-2 peuvent se former au cours de la dégradation de l'acide ascorbique (TATUM, SHAW et BERRY, 1969) ou des pigments (COLE et KAPUR, 1957). Dans ces conditions, il nous a paru opportun d'étudier l'évolution de l'acide ascorbique, des caroténoïdes et des composés volatils au cours du stockage du jus de tomate, afin de préciser les relations pouvant exister entre la perte ou la dégradation des uns et la formation des autres.

## Matériel et méthodes

### A. — *Matière première*

Les jus de tomate en boîtes métalliques vernissées, provenant de la Société LIBARON, ont été stockés en étuve à 30 et 37 °C. Des prélèvements ont été effectués après 3, 6, 9 et 12 mois de stockage.

### B. — *Isolement et analyse des composés volatils*

Les composés volatils ont été obtenus et analysés en utilisant les techniques décrites dans des publications précédentes. A partir des séparations obtenues en couplage CPV-SM (SECK et CROUZET 1973, SECK, CROUZET et PIVA 1976, SIESO et CROUZET 1977), les composés cités dans la présente étude ont été identifiés sur la base de leur temps de rétention.

### C. — *Dosage des composés carbonylés totaux*

L'entraînement des composés volatils par distillation en circuit fermé sous vide poussé a été réalisé à l'aide de l'appareil décrit par FORSS, JACOBSEN et RAMSHAW (1967), une fois l'extraction terminée (environ 3 heures), on ajoute dans le piège 50 ml d'une solution de 2,4 dinitro-phénylhydrazine. Le mélange est porté au bain-marie à 80 °C pendant 1 heure, les 2,4 dinitrophénylhydrazones formées sont dosées à 480 nm selon la méthode de LAPPIN et CLARK (1951). Les résultats sont exprimés en µmoles d'acétone pour 100 ml de jus ($\varepsilon$ max = 2,03 $10^4$).

### D. — *Dosage de l'acide ascorbique*

L'acide ascorbique a été dosé sur le jus selon la méthode de ROE et KUETHER (1943), adaptée par ROE et OESTERLING (1944) aux tissus végétaux. Nous avons effectué pour chaque lot conservé, plusieurs déterminations indépendantes (en

général deux prélèvements sur chacune des 4 boîtes constituant un lot) et exprimé la moyenne des résultats $\bar{x}$ ainsi que l'écart type calculé en utilisant la formule valable pour des échantillons de petite taille :

$$\sigma^2 = \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

F. — *Dosage des pigments*

Les pigments caroténoïdes ont été extraits, saponifiés et séparés d'après Davis (1965). La phase éthéropétrolique obtenue après saponification est séparée sur colonne d'alumine d'activité III, le carotène est élué à l'éther de pétrole, le lycopène par un mélange éther de pétrole-acétone (3/100 - V/V) et les autres caroténoïdes par l'acétone. Les xanthophylles sont extraites de la phase méthanolique par extraction à l'éther.

## Résultats

*Chromatographie en phase gazeuse*

Les chromatogrammes obtenus à partir du jus frais et des jus stockés à 37 °C, pendant des périodes allant de 3 mois à 1 an, sont donnés figures 1 à 5 (ceux que l'on obtient pour des mêmes durées de stockage à 30° sont analogues). Nous avons, par ailleurs, rassemblé dans le tableau 1 les pourcentages relatifs de chacun des principaux constituants présents dans les jus soumis aux différentes conditions de conservation.

L'ensemble de ces résultats nous montre que l'on a une augmentation des pourcentages relatifs du furfural, de la méthyl-6 heptène-5 one-2, de l'α terpinéol dès les premiers mois de stockage, cette augmentation étant d'autant plus importante que la température est plus élevée. Un accroissement du pourcentage relatif de l'alcool furfurylique ne s'observe que pour les jus entreposés à 37°. Quant à l'acétyl-2 furane et au méthyl-5 furfuraldéhyde, ils n'apparaissent qu'après 6 mois à 37 °C et 9 mois à 30 °C. Pour le benzaldéhyde, on observe que la quantité

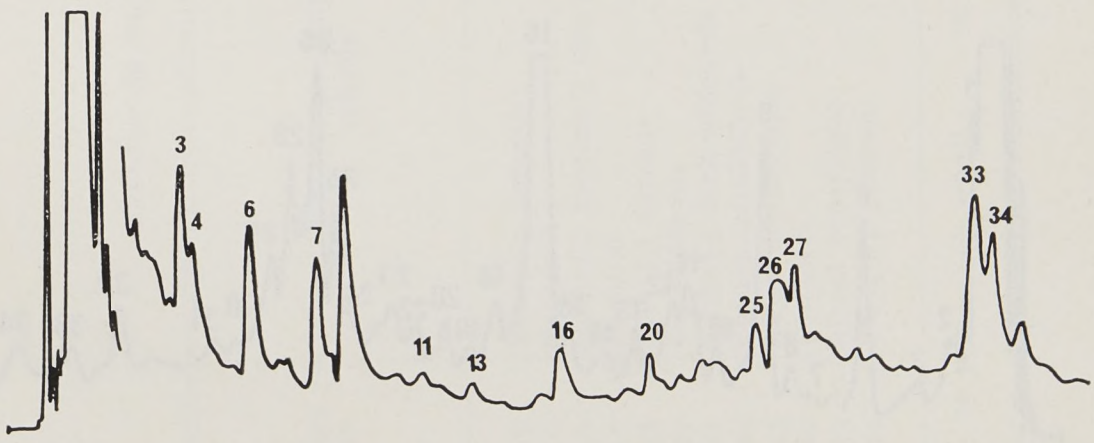



Fig. 1. — *Chromatogramme obtenu à partir de jus frais non stocké.*

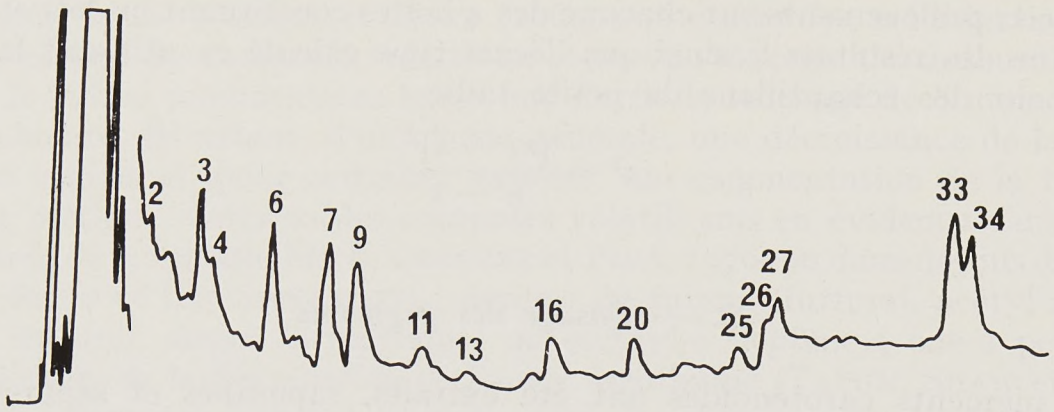



FIG. 2. — *Chromatogramme obtenu à partir de jus stocké à 37 °C pendant 3 mois.*

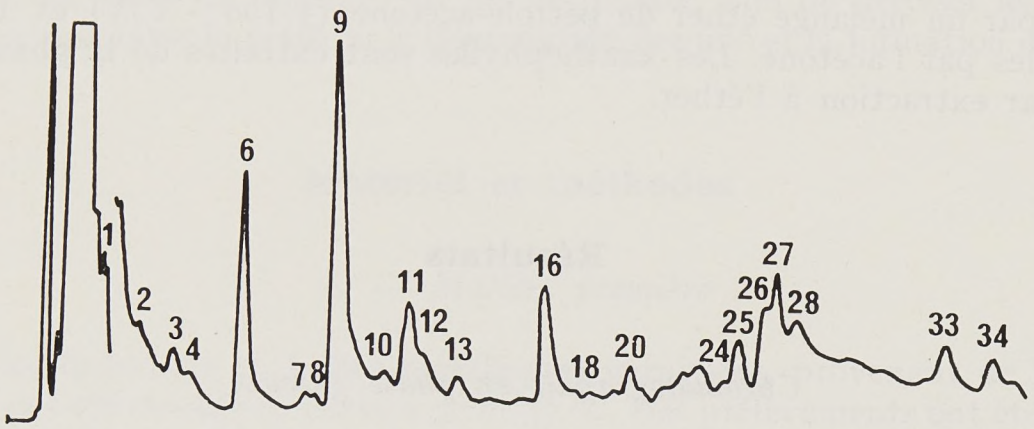



FIG. 3. — *Chromatogramme obtenu à partir de jus stocké à 37 °C pendant 6 mois.*

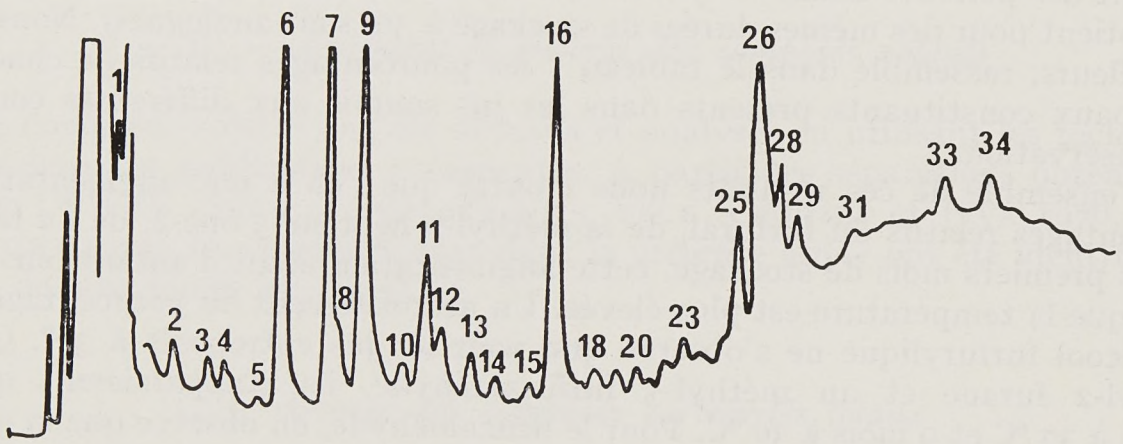



FIG. 4. — *Chromatogramme obtenu à partir de jus stocké à 37 °C pendant 9 mois.*

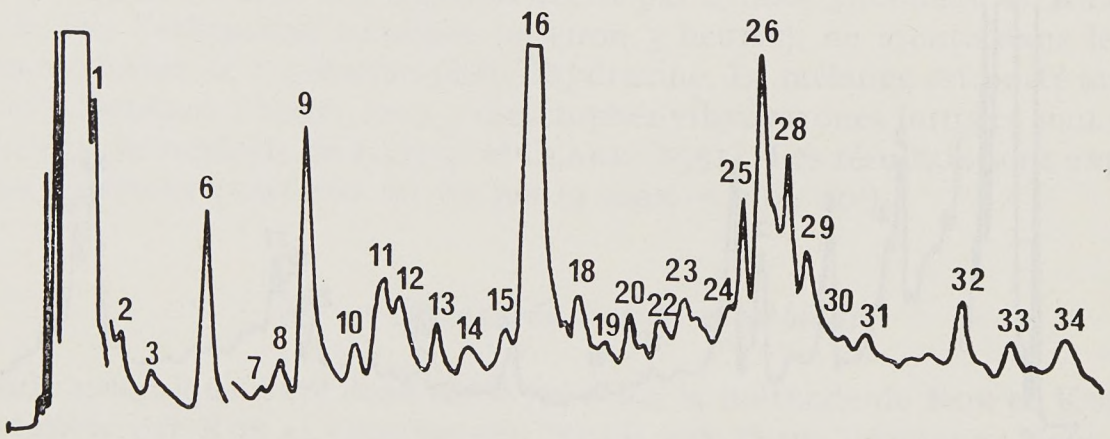



FIG. 5. — *Chromatogramme obtenu à partir de jus stocké à 37 °C pendant 1 an.*

TABLEAU I

*Influence du temps et de la température de stockage sur la composition de la fraction volatile du jus de tomate*

| Pics n° | Nature des composés volatils | Jus frais % (a) | Jus stockés | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 3 mois 30 °C % (a) | 3 mois 37 °C % (a) | 6 mois 30 °C % (a) | 6 mois 37 °C % (a) | 9 mois 30 °C % (a) | 9 mois 37 °C % (a) | 1 an 30 °C % (a) | 1 an 37 °C % (a) |
| 6 | Méthyl-3 butanol-1 | 11 | 13 | 20 | 13 | 22 | 23 | 25 | 25 | 10 |
| 9 | Heptanol-4 | 45 | 27 | 16 | 30 | 44 | 30,4 | 30 | 31 | 22 |
| 11 | Méthyl-6 heptène-5 one-2 | 1,7 | 2 | 3,4 | 3,6 | 5 | 4 | 5,4 | 5 | 5,4 |
| 16 | Furfural | 1,4 | 5 | 7 | 7 | 11 | 9,8 | 22 | 15 | 36,4 |
| 18 | Acétyl-2 furanne | 0 | 0 | 0 | 0 | + (b) | + (b) | 0,7 | + (b) | 2,1 |
| 20 | Benzaldéhyde | 1,1 | 2 | 2,4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 22 | Méthyl-5 furfuraldehyde | 0 | 0 | 0 | 0 | + (b) | + (b) | 1 | + (b) | 1,5 |
| 24 | Phényl-acétaldéhyde | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 25 | Alcool furfurylique | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4,5 | 3 | 4,8 |
| 26 | Terpinéol | 3,9 | 5 | 5,6 | 5 | 6 | 6 | 9 | 7 | 9,2 |
| 33 | Alcool benzylique | 17,8 | 18 | 18 | 16 | 3,4 | 4 | 2 | 4 | 3 |
| 34 | Phényl-2 éthanol | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1,5 | 2,5 | 1,4 |

(a) Pourcentage relatif. (b) Traces.

de ce produit double dès le début du stockage, puis son pourcentage relatif se stabilise quelles que soient la température et la durée du stockage. Inversement, on constate que certains composés présents dans le jus frais (alcool benzylique et à un degré moindre phényl-2 éthanol) voient leur pourcentage relatif diminuer dans les jus entreposés.

On note, par ailleurs, pour l'heptanol-4 et le méthyl-3 butanol, des variations se traduisant, soit par une augmentation, soit par une diminution de leur pourcentage relatif. De même, les composés 7 et 8 non identifiés sont présents en plus ou moins grande quantité indépendamment des conditions de stockage.

### *Dosage des composés carbonylés totaux*

Les résultats du dosage des composés carbonylés totaux sont donnés dans le tableau 2. Ils traduisent une augmentation importante de la concentration en ces composés par rapport à celle du produit frais ($3.10^6$ moles d'acétone pour 100 ml de jus).

### *Dosage de l'acide ascorbique*

L'acide ascorbique total, forme oxydée plus forme réduite est fortement affecté par le processus de stockage des jus de tomate (tabl. 3). Les teneurs trouvées après 3 mois à 30 et 37 °C ne sont pas significativement différentes, mais au-delà de cette période, la dégradation est d'autant plus rapide que la température est

TABLEAU 2

*Influence du temps et de la température de stockage sur la teneur en composés carbonylés du jus de tomate*

| | Composés carbonylés totaux (moles d'acétone / 100 ml de jus × $10^6$) | |
|---|---|---|
| Température de stockage / Durée du stockage | 30 °C | 37 °C |
| 3 mois | 6,8 | 8,8 |
| 6 mois | 12,9 | 34,7 |
| 9 mois | 22,0 | 51,0 |
| 1 an | 29,5 | 59,1 |

TABLEAU 3

*Influence du temps et de la température de stockage sur la teneur de l'acide ascorbique du jus de tomate*

Total (forme oxydée + forme réduite)

| | Teneur en acide ascorbique (mg/100 ml de jus) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Température de stockage / Durée du stockage | 30 °C | | | 37 °C | | |
| | $n$ | $\overline{X}$ | $\sigma$ | $n$ | $\overline{X}$ | $\sigma$ |
| 3 mois | 8 | 6,8 | 0,56 | 8 | 6,35 | 0,09 |
| 6 mois | 8 | 5,3 | 0,34 | 7 | 4,54 | 0,32 |
| 9 mois | 4 | 4,37 | 0,20 | 9 | 3,58 | 0,51 |
| 1 an | 8 | 3,41 | 0,19 | 7 | 2,52 | 0,45 |

$n$ = Nombre d'échantillons.
$\overline{X}$ = Teneur moyenne.
$\sigma$ = L'écart type déterminé d'après la formule $\sigma^2 = \frac{(X_i - \overline{X})^2}{n - 1}$

plus élevée. Une représentation graphique du logarithme de la concentration de l'acide ascorbique résiduel en fonction du temps donne les courbes de la figure 6 qui mettent en évidence l'existence de deux phénomènes obéissant chacun à une cinétique d'ordre un. En aucun cas, il n'a été possible de mettre en évidence de l'acide déhydroascorbique avant oxydation de l'acide ascorbique.

### *Dosage des pigments caroténoïdes*

Les résultats des dosages des pigments caroténoïdes (tabl. 4), indiquent une relative stabilité du β carotène durant le stockage. On retrouve 77 p. 100 de ce composé après 1 an à 37 °C pour une teneur initiale de 1,40 mg pour 100 ml dans le jus frais. On constate également que la fraction xanthophylle est très peu modifiée puisqu'on en retrouve 73 p. 100 dans les mêmes conditions, alors que la teneur initiale n'était que de 0,26 mg pour 100 ml de jus frais. Par contre, des pertes importantes sont observées au niveau du lycopène et à un degré plus élevé, au niveau des autres caroténoïdes. On ne retrouve que 37 p. 100 de ces constituants après 1 an à 37 °C. Nous avons porté sur la figure 7, les logarithmes des teneurs résiduelles en lycopène, carotène et autres caroténoïdes pour différents temps de stockage à

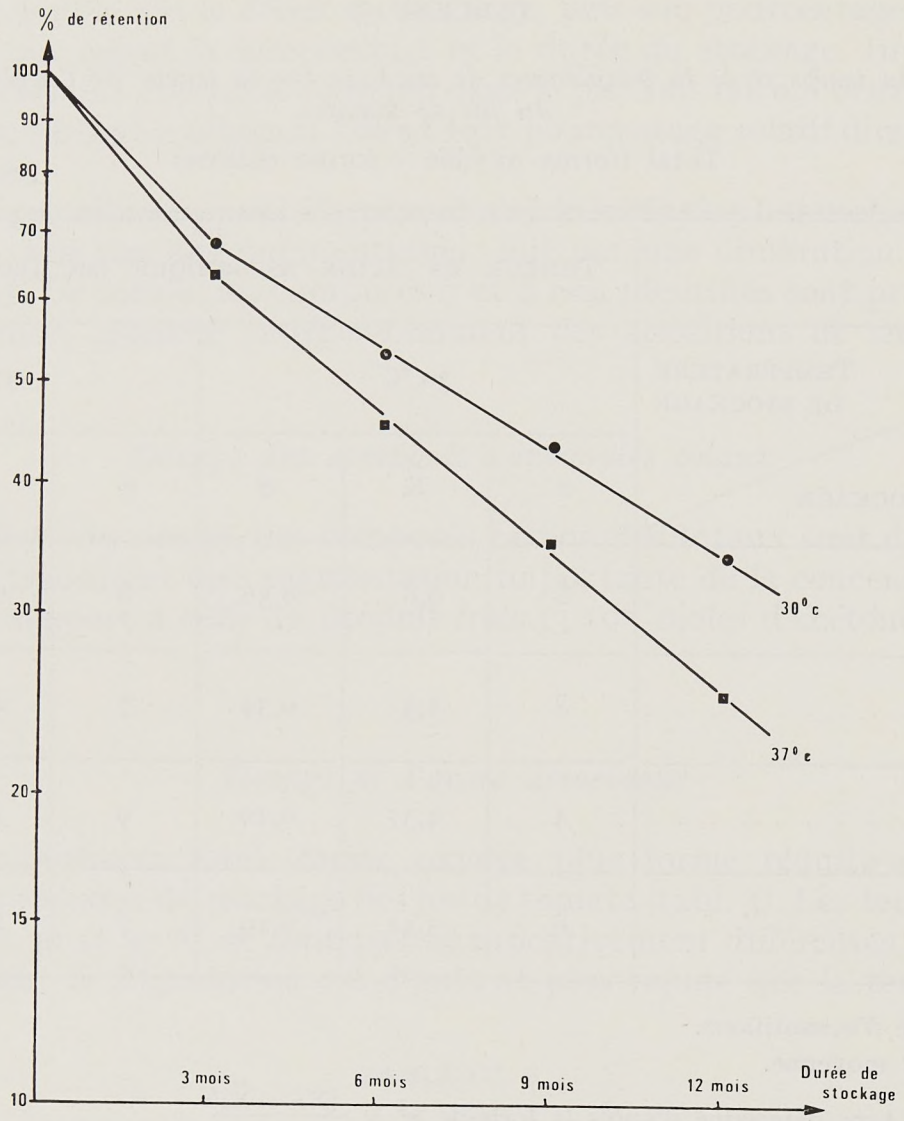



FIG. 6. — *Évolution de la teneur en acide ascorbique total en fonction de la durée de stockage à 30 °C et 37 °C.*

● ——— ● 30 °C

■ ——— ■ 37 °C

30 °C et 37 °C. Comme dans le cas de l'acide ascorbique, on retrouve que l'allure du phénomène diffère selon que la durée du stockage est inférieure ou supérieure à 3 mois; pour le lycopène et le β carotène on n'observe aucune dégradation des produits avant trois mois, par la suite intervient une dégradation qui suit une cinétique du premier ordre. Dans le cas des autres caroténoïdes, l'évolution est identique à celle observée pour l'acide ascorbique.

## Discussion

Les données relatives à l'augmentation du pourcentage relatif des composés carbonylés sont en accord avec ce que l'on observe pour d'autres jus de fruits. DISMORE et NAGY (1971) signalent l'apparition de composés carbonylés et plus particulièrement de furfural, dans des jus d'orange conservés. Par contre, nos résultats semblent être en contradiction avec ceux de NELSON et HOFF (1966) qui observent une variation en sens inverse (diminution des composés carbonylés et augmentation des alcools en cours de conservation). En fait, ces auteurs sug-

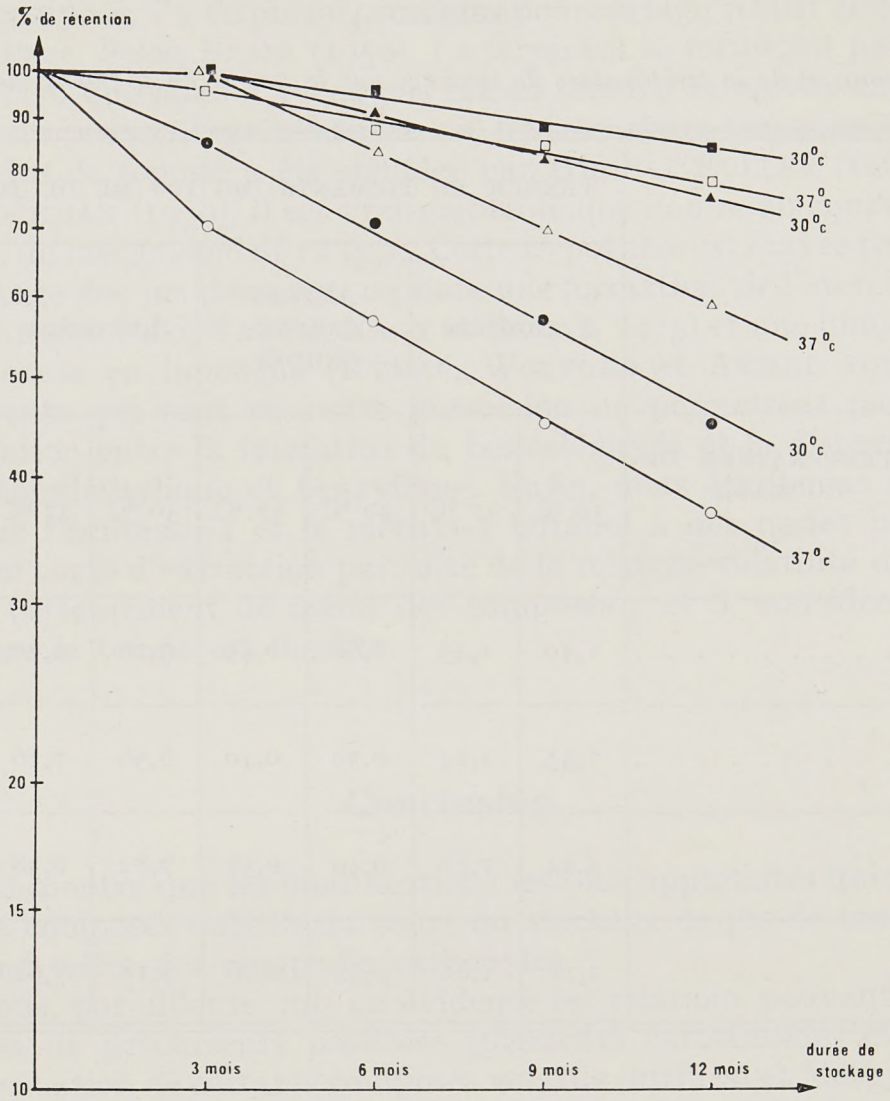



FIG. 7. — *Évolution de la teneur en caroténoïdes en fonction de la durée de stockage à 30 °C et 37 °C.*

■ ——— ■ β Carotène 30 °C
● ——— ● Autres caroténoïdes 30 °C
▲ ——— ▲ Lycopène 30 °C
□ ——— □ β Carotène 37 °C
○ ——— ○ Autres caroténoïdes 37 °C
△ ——— △ Lycopène 37 °C

gèrent qu'un milieu réducteur se trouve créé à l'interface étain-acide, dans des boîtes non vernissées et estiment que le phénomène ne doit pas se produire avec des boîtes vernissées, ce que nous observons effectivement. Nous avons obtenu une confirmation relative à la formation des composés carbonylés en déterminant les composés carbonylés totaux après entraînement de ces constituants. On note que leur teneur est multipliée par un facteur de 10 ou 20 après un an de conservation à 30 ou 37 °C.

La concentration en composés carbonylés totaux pourrait donc être utilisée comme un indice de dégradation permettant de caractériser, soit un temps de conservation trop long, soit une température trop élevée, soit les deux.

L'existence de deux mécanismes dans la dégradation de l'acide ascorbique du jus d'orange a été mise en évidence par NABY et SMOOT (1977) pour des températures de stockage voisines de celles que nous avons utilisées. L'allure des courbes que nous avons obtenues (fig. 6) nous suggère l'existence d'une oxydation rapide de l'acide ascorbique par l'oxygène présent dans l'espace de tête, suivie d'une dégradation anaérobie, comme l'atteste l'absence d'acide déhydroascorbique, premier chaînon de la dégradation oxydative de l'acide ascorbique.

TABLEAU 4

*Influence du temps et de la température de stockage sur la teneur en pigments du jus de tomate*

| | Teneur en pigments (mg/100 ml de jus) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | β carotène | | Autres caroténoïdes | | Lycopène | | Xanthophylles | |
| Température de stockage / Durée du stockage | 30 °C | 37 °C | 30 °C | 37 °C | 30 °C | 37 °C | 30 °C | 37 °C |
| 3 mois | 1,40 | 1,35 | 0,60 | 0,49 | 9,20 | 9,20 | 0,25 | 0,24 |
| 6 mois | 1,35 | 1,24 | 0,50 | 0,40 | 8,56 | 7,76 | 0,23 | 0,22 |
| 9 mois | 1,24 | 1,18 | 0,40 | 0,32 | 7,82 | 6,58 | 0,21 | 0,20 |
| 1 an | 1,18 | 1,08 | 0,32 | 0,26 | 7,18 | 5,62 | 0,21 | 0,19 |

La cinétique de dégradation des pigments que nous avons qualifiée d' « autres caroténoïdes » est du même type, dans ce cas on peut avancer l'hypothèse, pour le second stade du processus, d'une dégradation ne mettant pas en jeu d'oxygène moléculaire. C'est vraisemblablement le même mécanisme que l'on peut invoquer pour rendre compte de la dégradation du β carotène et du lycopène après 3 mois de stockage puisque l'oxygène emprisonné lors de la mise en boîte a été utilisé à ce moment-là.

Le furfural ainsi que les autres composés furaniques dont la concentration croît au cours de la conservation, peuvent provenir de la dégradation des glucides (Fragerson 1969, Feretti, Flanagan et Ruth, 1970) ou de celle de l'acide ascorbique (Cier, Nofre et Devron 1959, Kurata 1967, Tatum 1969). L'existence d'une relation linéaire entre le pourcentage relatif de furfural formé et la teneur en acide ascorbique perdu aux différents temps de stockage à 30 et 37 °C permet d'avancer que la plus grande partie du furfural provient de la dégradation de l'acide ascorbique.

Il est, par ailleurs, possible de mettre en évidence une relation linéaire entre l'apparition de la méthyl-6 heptène-5 one-2 et la dégradation du β carotène et des « autres caroténoïdes »; alors que la relation entre le pourcentage de cette cétone et la teneur en lycopène est beaucoup plus lâche. Dans ces conditions, et compte tenu des résultats des cinétiques de dégradation, il est vraisemblable que la méthyl-6 heptène-5 one-2 provient de la dégradation des « autres caroténoïdes » et non du lycopène ainsi que le suggèrent Schormuller et Kochman (1965).

Nous avons signalé qu'en plus du furfural et de la méthyl-6 heptène-5 one-2,

un troisième composé, l'α terpinéol, voit son pourcentage relatif augmenter dès le début du stockage. Selon BLAIR (1950), l'α terpinéol se formerait par hydratation du limonène, bien que nous n'ayons pas été en mesure de mettre en évidence des modifications du pourcentage relatif de cet hydrocarbure terpénique dont la présence dans le jus de tomate a été signalée par HEIN et FULLER (1963) et SCHORMULLER et KOCHMAN (1970), il est vraisemblable que l'on a, au cours de la conservation des jus, un mécanisme de ce type. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'au cours du stockage des jus d'orange, on note une formation de l'αterpinéol (RYMAL, WOLFORD et AHMED 1968, TATUM, NAGY et BERRY, 1975) et une diminution simultanée de la teneur en limonène (RYMAL, WOLFORD et AHMED 1968).

Les éléments qui sont en notre possession ne permettent pas de dire s'il existe une relation entre la formation du benzaldéhyde et la disparition partielle des alcools phényléthylique et benzylique. Enfin, nous attribuons les variations observées pour l'heptanol-4 et le méthyl-3 butanol à des pertes plus ou moins importantes en cours d'extraction par suite de la relative volatilité de ces composés. Il en est certainement de même des composés 7 et 8, non identifiés dont la variabilité dans le temps est insolite.

## Conclusion

Ce travail montre que les modifications les plus apparentes qui interviennent au niveau des composés volatils au cours du stockage de jus de tomate en boîtes vernissées sont celles des composés carbonylés.

Nous avons, par ailleurs, mis en évidence les relations pouvant exister entre la dégradation de précurseurs possibles (pigments caroténoïdes et acide ascorbique) et la formation de certains composés volatils (furfural et Méthyl-6 heptène-5 one-2) mais il reste à mieux préciser les mécanismes des différentes réactions de transformation. Néanmoins, nous proposons une technique relativement simple pour l'étude et le contrôle usuel de l'arôme du jus de tomate stocké à une température trop élevée ou pendant une durée trop importante.

*Reçu pour publication en décembre 1978.*

## Remerciements

Les auteurs remercient la Société LIBARON, 30600 Vaubert qui leur a fourni les échantillons de jus nécessaires à cette étude ainsi que le G.E.R.D.A.T. qui a financé une partie de ces recherches (ATP — Arômes).

## Summary

*Changes of tomato juice volatile components during storage*
*Role of ascorbic acid and carotenoid pigments*

Canned tomato juice in enamel-lined cans was stored at 30 and 37 °C for 12 months. Samples were analyzed periodically for volatile components, carbonyl compounds, ascorbic acid and carotenoïd pigments to determine quality of the product. During this period an increase of the relative amount of carbonyl compounds (furfural, 6-méthyl-5-heptène-2-one and benzaldéhyde)

and of α-terpinéol was found. For phenyl ethanol and benzylalcohol a decrease of their relative amounts was observed during the same time.

The decrease of the amount of ascorbic acid after three months follows a first order reaction during an oxydative process and the formation of furfural seems to be related to the degradation of ascorbic acid.

In the same way 6-méthyl-5-hepten-2-one is certainly issued from carotenoïd pigments.

Key-Words : *Tomato, storage, volatile components, carbonyl compounds, ascorbic acid, carotenoïds.*

## Références bibliographiques


Blair J. S., Godar E. M., Masters J. E., Riesters D. W., 1950. Exploratory experiments to identify some of the chemical reactions causing flavor deterioration during storage of canned orange juice. American Can Co Bulletin, Maywood.

Cier A., Nofre C., Devron, 1959. Étude de la dégradation de l'acide ascorbique sous atmosphère inerte. *Bull. Soc. Chim. France*, nº 1, 74-77.

Cole E. R., Kapur N. S., 1957. Stability of lycopene. I Degradation by oxygen II Oxidation during heating of tomato pulp. *J. Sci. Fd. Agric.*, **8**, 360-365 et 366-368.

Davies B. H., 1965. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Goodwin T. W. Ed., Acad. Press, London and New-York.

Dismore H., Nagy S., 1971. A rapid gas chromatographic method of studying volatile carbonyls compounds from orange juice and their change during storage. *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 517-519.

Forss D. A., Jacobsen V. M., Ramshaw E. H., 1967. Concentration of volatile compounds from dilute solution. *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 1104-1107.

Fragerson I. S., 1969. Thermal degradation of carbohydrates. *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 747-750.

Ferreti A., Flanagan V. P., Ruth J. M., 1970. Noenzymatic browning in a lactose casein model system. *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 13-18.

Hein R. E., Fuller G. W., 1963. Gas chromatographic studies on volatile compounds from processed tomatoes. Conferences on Advances in Flavor Research, Southern Utilisation Research and Development Division. U.S.D.A. New Orléans.

Hummel M., Okey R., 1950. Relation of concentration of canned tomato products to storage losses of ascorbic acid. *J. Food Sci.*, **15**, 405-414.

Kurata T., Sakurai Y., 1967. Degradation of L ascorbic acid and mechanism of noenzymatic browning reaction. II Non oxidative degradation of L ascorbic acid including the formation 3 desoxy-L-pentosone. *Agr. Biol. Chim.*, **31**, 170-176.

Lappin G. R., Clark L. C., 1951. Colorimetric method for determination of traces of carbonyl compounds. *Anal. Chem.*, **23**, 541-542.

Luh B. S., Leonard S. J., Marsh G. L., 1958. Storage changes in tomato juice. *Food Technol.*, **12**, 380-384.

Nagy S., Smoot J. M., 1977. Temperature and storage effects on percent retention and percent U.S. recommanded dietary allowance of Vit C in canned single-strength orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 135-138.

Nelson P. E., Hoff J. E., 1969. Tomato volatiles: Effect of variety; processing and storage time. *J. Food Sci.*, **34**, 53-56.

Roe J. F., Kuether C. A., 1943. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4 dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.*, **147**, 399-407.

Roe J. H., Œsterling M. J., 1944. The determination of dehydroascorbic and ascorbic acid in plant tissues by the 2-4 dinitrophenylhydrazine method. *J. Biol. Chem.*, **152**, 511-517.

RYMAL K. S., WOLFORD R. W., AHMED E. M., DENNISON R. A., 1968. Changes in volatile flavor constituants of canned single-strength orange juice as influenced by storage temperature. *Food Technol.*, **22**, 1592-1595.

SCHORMULLER J. et KOCHMANN H. J., 1969. Gas chromatographisch massenspektrometrische analyse leichtflüchtiger aromastoffe der tomate. *Z. Lenbens. Unters. U. Forsch.*, **141**, 1-9.

SECK S., CROUZET J., 1973. Constituants volatils de *lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry*, **12**, 2925-2930.

SECK S., CROUZET J., PIVA M, T., 1976. Influence des traitements thermiques sur la nature des constituants volatils de la tomate. *Ann. Technol. Agric.*, **25**, 85-95.

SIESO V., CROUZET J., 1977. Tomato volatile compoıents; effect of processing. *Food Chem.*, **2**, 241-252.

TATUM J. H., SHAW P. E., BERRY R. E., 1969. Degradation products of ascorbic acid. *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 38-40.

TATUM J. H., NAGY S., BERRY R. E., 1975. Degradation products formed in canned single — strength orange juice during storage. *J. Food Sci.*, **40**, 707-709.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28**, (1), 31-40.

# Flore malolactique de mouts et de vins du Canton du Valais (Suisse).

## II. — Evolution des populations de lactobacilles et de pédiocoques au cours de la vinification d'un vin blanc (un Fendant) et d'un vin rouge (une Dole)

R. Maret et T. Sozzi

*Département de Développement Technologique*
*Société d'Assistance Technique pour Produits Nestlé S.A.,*
*Lausanne, Suisse*

---

## Résumé

L'évolution des populations de lactobacilles et de pédiocoques au cours de la vinification d'un vin blanc, un Fendant (Chasselas) et d'un rouge, une Dôle (Gamay + Pinot noir) a été étudiée.

Les résultats ont montré que la plupart des lactobacilles homofermentaires *L. plantarum* *L. casei* présents en abondance dans les moûts, disparaissaient très rapidement pour faire place aux lactobacilles hétérofermentaires (*L. hilgardii*, *L. brevis*). Les pédiocoques (*P. pentosaceus* et *P. cerevisiae*) n'apparaissaient que tardivement dans les vins étudiés.

Mots clés : *vinification, moûts et vins du Valais, lactobacilles, pédiocoques, évolution.*

---

## Introduction

Dans un précédent travail (Maret et Sozzi, 1977) nous avons présenté les résultats d'une étude générale des populations de lactobacilles et de pédiocoques présents dans des moûts et des vins prélevés en divers lieux du vignoble du Canton du Valais (Suisse).

Il nous a paru logique, dans un deuxième temps, d'examiner l'évolution, en l'un ou l'autre cas, de cette flore malolactique au cours de la vinification.

En effet, les microorganismes présents dans les moûts comme contaminants naturels ne sont probablement pas tous capables de survivre aux profondes modifications de leur milieu originel, une fois que surviennent les processus de la fermentation alcoolique. Nous avons donc choisi d'étudier les modifications de la composition floristique de deux vins différents : un Fendant (vin blanc) et une Dôle (vin rouge), à diverses étapes de leur vinification. Les résultats obtenus font l'objet de la présente publication.

## Partie expérimentale

### 1. — *Les échantillons*

*Deux vins ont été examinés, soit :*

a) *Un Fendant (Chasselas), en cuve de 6 000 l.*

b) *Une Dôle (Gamay + Pinot noir) en cuve de 20 000 l.*

### 2. — *Microbiologie*

La technique d'isolement, les tests physiologiques et les méthodes de classification ont été les mêmes que décrites précédemment (Maret et Sozzi, 1977).

Nous avons, en plus de ceux cités en Maret et Sozzi (1977) utilisé les milieux d'isolements suivants :

a) *Milieu d'isolement pour Acetobacter modifié (M-A) :*

| | |
|---|---|
| Extrait de levure (Difco) | 20 g |
| Peptone | 10 g |
| Glucose | 50 g |
| $H_2O$ | 1 g |

pH ajusté à 4,0 avec de l'acide malique

b) *Milieu de Fornachon* (1964)

Comme dans notre précédente communication (Maret et Sozzi, 1977) nous avons également utilisé le système API (Vixotab, La Balme-les-Grottes, France) pour caractériser les souches isolées.

## Résultats et discussion

### 1. — *Le Fendant*

#### 1.1. — *Les isolements*

Les résultats des isolements par échantillon ont été présentés dans le tableau 1.

TABLEAU I

*Lactobacilles et pédiocoques isolés à différentes étapes de la vinification d'un Fendant*

| Date de prélèvement | Étape de la vinification | Milieu d'isolement | code | Morphologie |
|---|---|---|---|---|
| 8-10-1973 | Moût au pressage . . . . . | M-A | Vi 93 | Bacilles |
| | | Fornachon | Vi 97 | Bacilles |
| | | | Vi 98 | Bacilles |
| | | Weiller | Vi 92 | Bacilles |
| 15-10-1973 | Fin de la fermentation alcoolique . . . . . | M-A | Vi 112 | Bacilles |
| | | Weiller | Vi 114 | Bacilles |
| 19-11-1973 | Vin en fermentation malolactique . . . . . | M-A | Vi 165 | Bacilles |
| | | MRS | Vi 172 | Coques |
| 2-12-1974 | Vin en fin de fermentation malolactique . . . . . | M-A | Vi 184 | Bacilles |

1.2. — *Caractères biochimiques et physiologiques des souches isolées.*

Les caractères biochimiques habituels ont été déterminés par API-tests. L'évaluation de quelques caractères complémentaires étudiés à part (cf. MARET et SOZZI, 1977) a été résumée dans les tableaux 2 et 3.

L'utilisation des API-tests nous a grandement servi pour éliminer au maximum les clones semblables isolés sur un même milieu ou sur divers milieux à partir d'un échantillon de départ identique.

A l'instar de WEILLER et RADLER (1970), nous avons considéré comme *L. hilgardii* les lactobacilles hétérofermentaires fermentant le xylose et ne fermentant pas l'arabinose.

1.21. — *Moût de fendant au pressurage* (tabl. 2).

La flore dominante était le type *L. plantarum*. Nous avons cependant isolé une souche de *L. casei alactosus* et une de *L. brevis* qui ne fermentait nettement que le fructose parmi les hexoses. Cette souche ne se développait qu'avec peine à pH 3,5 ou en présence de 15 p. 100 d'alcool.

1.22. — *Fendant en fin de fermentation alcoolique* (tabl. 3)

Les lactobacilles hétérofermentaires dominaient. Nous les avons classés comme *L. hilgardii*. Nous y avons également retrouvé une souche de *L. casei alactosus*.

La souche de *L. hilgardii* Vi 114 avait de la peine à se développer en présence de 15 p. 100 d'alcool.

TABLEAU 2

*Caractères biochimiques et physiologiques des souches isolées de moûts de Fendant au pressage*

| Taxonomie | *L. casei alactosus* | *L. plantarum* | | *L. brevis* |
|---|---|---|---|---|
| Caractères \ Code | Vi 93 | Vi 92 | Vi 97 | Vi 98 |
| — Production de $CO_2$ | — | — | — | + |
| — Croissance ([a]) : | | | | |
| à 10 °C | + | + | + | + |
| à 30 °C | + | + | + | + |
| à 45 °C | — | — | — | — |
| à pH 3,5 | + | + | + | (+)([b]) |
| à pH 4,0 | + | + | + | — |
| à pH > 4 et < 8 | + | + | + | — |
| En présence d'alcool : | | | | |
| à 5 p. 100 | + | + | + | + |
| à 10 p. 10 | + | + | + | + |
| à 15 p. 100 | + | + | + | — |
| — Acide lactique : | | | | |
| L (+) | + | + | + | + |
| D (—) | — | + | + | + |

([a]) Test en M.R.S. comme milieu de base (cf. MARET et SOZZI, 1977).
([b]) Croissance faible.

1.23. — *Fendant en fermentation malolactique* (tabl. 3).

Les *L. hilgardii* étaient dominants. Nous avons isolé en plus une souche de *Pediococcus cerevisiae*.

1.24. — *Fendant après la fermentation malolactique* (tabl. 3).

Les lactobacilles dominants étaient encore de type *L. hilgardii*. L'ensemble des lactobacilles hétérofermentaires examinés ne fermentaient activement que l'arabinose et/ou le xylose, de même que le fructose.

## 2. — *La Dôle*

### 2.1. — *Les isolements*

Les résultats des isolements par échantillon ont été présentés dans le tableau 4.

### 2.2. — *Caractères biochimiques et physiologiques des souches isolées.*

L'évaluation des caractères biochimiques complémentaires autres que ceux déterminés par API-tests a été présentée par les tableaux 5 et 6.

TABLEAU 3

*Caractères biochimiques et physiologiques de souches isolées de moûts de Fendant en fin de fermentation alcoolique* (A), *pendant* (B) *et après la F.M.L.* (C).

| | A | | B | | C |
|---|---|---|---|---|---|
| Taxonomie | *L. casei alactosus* | *L. hilgardii* | *L. hilgardii* | *Pediococcus cerevisiae* | *L. hilgardii* |
| Caractères \ Code | Vi 112 | Vi 114 | Vi 165 | Vi 172 | Vi 184 |
| — Production de $CO_2$ . . | — | + | + | — | + |
| — Croissance[a] : | | | | | |
| à 10 °C . . . . . | + | — | — | — | — |
| à 30 °C . . . . . | + | + | + | + | + |
| à 45 °C . . . . . | — | — | — | — | — |
| à pH 3,5 . . . . . | + | + | + | (+)[b] | (+)[b] |
| à pH 4,0 . . . . . | + | + | + | + | + |
| à pH > 4 et < 8 . . | + | + | + | + | + |
| En présence d'alcool : | | | | | |
| à 5 p. 100 . . . . . | + | + | + | + | + |
| à 10 p. 100 . . . . . | + | + | + | + | + |
| à 15 p. 100 . . . . . | + | — | + | — | + |
| Acide lactique : | | | | | |
| L (+) . . . . . | + | + | + | + | + |
| D (—) . . . . . | — | — | + | + | + |

[a] Test en M.R.S. comme milieu de base (cf. MARET et SOZZI, 1977).
[b] Faible croissance.

2.21. — *Moût de Dôle au début de cuvaison* (tabl. 6).

La flore dominante était constituée de lactobacilles hétérofermentaires (*L. brevis*).

2.22. — *Dôle en fin de cuvaison* (tabl. 5)

La flore dominante lactobacillaire se composait en proportions numériquement à peu près égales d'homofermentaires (*L. plantarum*) et d'hétérofermentaires (*L. brevis*). Nous avons isolé en plus une souche de *Pediococcus pentosaceus*.

Les tests de croissance à différents pH montraient que les hétérofermentaires avaient de la difficulté à se développer à pH 3,5.

2.23. — *Dôle après cuvage et pressurage* (tabl. 6).

Les *L. plantarum* étaient fortement dominants.

2.24. — *Dôle en phase initiale de fermentation malolactique* (tabl. 6).

Les *L. hilgardii* et *brevis* étaient très nombreux. Une souche de *Pediococcus cerevisiae* fut également isolée.

TABLEAU 4

*Lactobacilles et pédiocoques isolés à différentes étapes de la vinification d'une Dôle*

| Date de prélèvement | Étape technologique et/ou microbiologique | Milieu d'isolement | Code | Morphologie |
|---|---|---|---|---|
| 8-10-1973 | Moût en début de cuvaison | M-A | Vi 76 | Bacilles |
| | | Fornachon | Vi 77 | Bacilles |
| 15-10-1973 | Moût en fin de cuvage . . | Fornachon | Vi 105 | Bacilles |
| | | MRS | Vi 101 | Bacilles |
| | | Weiler | Vi 109 | Bacilles |
| | | | Vi 117 | Bacilles |
| | | | Vi 108 | Coques |
| 25-10-1973 | Vin après cuvage et pressage | M-A | Vi 152 | Bacilles |
| | | Fornachon | Vi 125 | Bacilles |
| 19-11-1973 | Vin en fermentation malolactique . . . . . | M-A | Vi 163 | Bacilles |
| | | MRS | Vi 160 | Bacilles |
| | | | Vi 158 | Coques |
| 2-12-1974 | Vin en fin de fermentation malolactique . . . . . | M-A | Vi 176 | Bacilles |
| | | | Vi 177 | Bacilles |

2.25. — *Dôle en phase finale de fermentation malolactique* (tabl. 6).

La flore lactobacillaire était pauvre et constituée essentiellement de *L. hilgardii*. Une souche de *L. casei alactosus* put également être isolée.

L'ensemble des résultats des isolements a été résumé dans le tableau 7.

Cette étude a montré que les moûts de Fendant et de Dôle prélevés immédiatement après la vendange ou au début de la fermentation alcoolique étaient riches en lactobacilles homofermentaires de type *plantarum*. Les lactobacilles hétérofermentaires étaient souvent moins nombreux dans ces mêmes échantillons mais tendaient à supplanter les homofermentaires quelques temps après la fin de la fermentation alcoolique.

Les pédiocoques se sont révélés être des contaminants se développant plutôt tardivement dans les vins considérés.

TABLEAU 5

*Caractères biochimiques et physiologiques de lactobacilles et de pédiocoques isolés de Dôle au début* (A) *et en fin de cuvage* (B)

| | A | | B | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Taxonomie | *L. brevis* | | *L. plantarum* | | | *L. brevis* | *P. pentosaceus* |
| Caractères \ Code | Vi 76 | Vi 77 | Vi 105 | Vi 109 | Vi 117 | Vi 101 | Vi 108 |
| — Production de $CO_2$ | + | + | — | — | — | + | — |
| — Croissance[a] : | | | | | | | |
| à 10 °C . . . . . | + | — | + | + | + | — | + |
| à 30 °C . . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| à 45 °C . . . . . | — | — | + | — | — | — | — |
| à pH 3,5 . . . . . | (+)[b] | (+)[b] | + | + | + | (+)[b] | (+)[b] |
| à pH 4,0 . . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| à pH > 4 et < 8 . | + | + | + | + | + | + | + |
| En présence d'alcool : | | | | | | | |
| à 5 p. 100 . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| à 10 p. 100 . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| à 15 p. 100 . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| Acide lactique : | | | | | | | |
| L (+) . . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| D (—) . . . . . | + | + | + | + | + | + | + |

[a] Test en M.R.S. comme milieu de base (cf. MARET et SOZZI, 1977).
[b] Faible croissance.

Les souches de lactobacilles de pédiocoques une fois isolées et cultivées en milieux synthétiques se sont révélées souvent incapables de se développer à nouveau dans du vin. Certaines, isolées pourtant de vins presque faits, éprouvaient même des difficultés à se développer en milieux synthétiques lors de la réalisation des tests de croissance à bas pH, ou à haute teneur en alcool.

Durant la phase de la fermentation malolactique des deux vins étudiés, les lactobacilles les plus abondants ont été sans nul doute les lactobacilles hétérofermentaires (*brevis* et *hilgardii*). Ils ont été certainement les principaux responsables — en plus des *Leuconostoc œnos*, également présents dans ces vins — des processus de désacidification biologique.

## Conclusion

La flore malolactique de lactobacilles et de pédiocoques présente, dans un vin blanc (Fendant) et un vin rouge (Dôle) du Canton du Valais (Suisse), à diverses étapes technologiques ou microbiologiques des processus de vinification, a été étudiée et les espèces présentes déterminées et dénombrées.

TABLEAU 6

*Caractères biochimiques et physiologiques de lactobaciles et de pédiocoques isolés de Dôle après cuvage et pressage* (A), *en phase initiale* (B) *et en phase finale* (C) *de la F.M.L.*

| | A | | B | | | C | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Taxonomie | *L. plantarum* | | *L. hilgardii* | *L. brevis* | *Pediococcus cerevisiae* | *L. casei alactosus* | *L. hilgardii* |
| Caractères \ Code | Vi 152 | Vi 125 | Vi 160 | Vi 163 | Vi 158 | Vi 177 | Vi 176 |
| — Production de $CO_2$ | — | — | + | + | — | — | + |
| — Croissance[a] : | | | | | | | |
| à 10 °C . . . . . | + | + | — | — | — | + | — |
| à 30 °C . . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| à 45 °C . . . . . | — | — | — | — | — | — | — |
| à pH 3,5 . . . . . | + | + | (+)[b] | (+) | (+) | (+) | (+) |
| à pH 4,0 . . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| à pH > 4 et < 8 . | + | + | + | + | + | + | + |
| En présence d'alcool : | | | | | | | |
| à 5 p. 100 . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| à 10 p. 100 . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| à 15 p. 100 . . . . | + | + | + | + | — | + | (+) |
| Acide lactique : | | | | | | | |
| L (+) . . . . . | + | + | + | + | + | + | + |
| D (—) . . . . . | + | + | + | + | + | + | |

[a] Test en M.R.S. comme milieu de base (cf. MARET et SOZZI, 1977).
[b] Faible croissance.

En début de vinification, sont présents des lactobacilles homo- et hétérofermentaires (*L. casei alactosus, L. plantarum, L. brevis*) avec dominance marquée des homofermentaires. Les pédiocoques n'ont pas apparu dans ces isolements.

Lors du déclenchement de la fermentation malolactique, les lactobacilles homofermentaires ont pratiquement disparu au profit des espèces hétérofermentaires (*brevis* et *hilgardii*). Les pédiocoques (*pentosaceus* et *cerevisiae*) apparaissaient alors régulièrement dans les isolements.

En plus des *Leuconostoc œnos*, également présents dans ces vins, les lactobacilles hétérofermentaires *L. brevis* et surtout *L. hilgardii* nous ont paru les microorganismes principalement engagés dans le processus de désacidification biologique de la fermentation malolactique qui représente une étape capitale de la vinification des vins considérés.

TABLEAU 7

*Tableau récapitulatif de la répartition des diverses souches de lactobacilles et de pédiocoques capables d'effectuer la fermentation malolactique, isolées d'un Fendant et d'une Dôle (Valais/ Suisse) à diverses étapes technologiques ou microbiologiques du processus de vinification*

| Taxonomie / Échantillons | *L. casei alactosus* | | *L. plantarum* | | *L. brevis* | | *L. hilgardii* | | *Pediococcus pentosaceus* | | *Pediococcus cerevisiae* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F | D | F | D | F | D | F | D | F | D | F | D |
| Moût (Fendant et Dôle) | 1 | | 2 | | 1 | 2 | | | | | | |
| Vin en fin de cuvage (Dôle) | | | | 3 | | 1 | | | | 1 | | |
| Vin après cuvage et pressage (Dôle), en fin de fermentation alcoolique (Fendant et Dôle) | 1 | | | 2 | | | 1 | | | | | |
| Vin en fermentation malolactique (Fendant et Dôle) | | | | | | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 |
| Vin en fin de fermentation malolactique (Fendant et Dôle) | | 1 | | | | | 1 | 1 | | | | |

Des essais récents nous ont montré que les lactobacilles se développaient de préférence dans des vins à pH élevé ($\leqslant$ 3.4) : or, dans la région considérée il est assez fréquent de rencontrer de tels pH dans les moûts et les vins. D'autre part pour ne pas perturber l'adaptation de ces microorganismes du milieu vinaire, il est préférable de les cultiver sur vin stérile avec un minimum de passages sur MRS agarisé à pH 5,0 pour les isoler.

*Reçu pour publication en décembre 1978.*

## Remerciements

Nous remercions particulièrement M^me^ S. WEHRSPANN et M. N. d'AMICO pour leur précieuse collaboration.

Nous remercions également les caves THÉTAZ Frères à Fully (V.S.) pour la mise à disposition du matériel d'étude.

## Summary

*Malolactic flora of musts and wines from the canton of Valais (Switzerland)*

II. — *Population and evolution of Lactobacilli and Pediococci during the wine making process of Fendant (white wine) and of Dôle (red wine)*

Population evolution of lactobacilli and pediococci during the wine making process of a white wine, Fendant (Chasselas) and of a red wine, Dôle (Gamay and black Pinot) was studied.

The results showed that most homofermentative lactobaccilli (*L. plantarum*, *L. casei*) dominant in the must disappeared rapidly and were replaced by heterofermentative lactobacilli (*L. hilgardii*, *L. brevis*). The pediococci (*P. pentosaceus* and *P cerevisiae*) appeared later in the wine making process.

## Références bibliographiques

FORNACHON J. C. M., 1964. *American Journal at Enology and viticulture*, **15**, 184-186.

MARET R., SOZZI T., 1976. Flore lactique de fromageries d'alpage Suisses. *Le Lait*, **56**, 304-318.

MARET R., SOZZI T., 1977. Flore malolactique de moûts et de vins du Canton de Valais-Suisse I. Lactobacilles et pédiocoques. *Ann. Technol. agric.*, **27**, 255-273.

WEILLER H. G., RODLER F., 1970. Milchsaurebakterien aus Wein und von Rebenblattern. *Zbl. Bakt. II*, **124**, 707-732.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (1), 41-55.

# Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse).

## III. — Les leuconostocs

R. MARET, T. SOZZI et D. SCHELLENBERG

*Département de Développement technologique,*
*Société d'Assistance technique pour Produits Nestlé S.A., Lausanne, Suisse*

## Résumé

De tous les vins valaisans étudiés en fermentation malolactique il a été possible d'isoler des *Leuconostoc oenos*. Des méthodes permettant l'isolement systématique, la culture et la conservation de ces microorganismes ont été testées avec succès. Les températures et les valeurs de pH de croissance optimale, les fermentations sucrées, la tolérance au $SO_2$, les teneurs en G + C des ADN ont été examinées.

Les observations en microscopie optique et électronique ont montré un dimorphisme entre les *L. oenos* cultivés en milieu synthétique et ceux cultivés en milieu vinaire.

Les *L. oenos* ont été considérés comme les plus importants microorganismes capables d'effectuer la désacidification biologique des vins étudiés, au côté des lactobacilles hétérofermentaires (*L. hilgardii* et *L. brevis*).

Mots clés : *moûts et vins du Valais, fermentation malolactique, leuconostocs, isolement, culture, conservation, biochimie, microscopie.*

## Introduction

Dans une première étude (MARET et SOZZI, 1977) nous avions publié les résultats d'un examen général des populations de lactobacilles et de pédiocoques présents dans divers échantillons de moûts et de vins du vignoble valaisan. Nous avions, ensuite, suivi l'évolution des populations de ces mêmes microorganismes au cours de la vinification (MARET et SOZZI, 1978). Or, dans tous les échantillons de vins en pleine fermentation malolactique, il était possible, à l'observation micros-

copique, de déceler la présence de très petites coques en chaînes plus ou moins longues que nous ne parvenions que rarement à isoler sur les divers milieux utilisés. Après une étude plus approfondie, nous sommes finalement parvenus à isoler sélectivement les *Leuconostoc oenos* de n'importe quel vin en fermentation malolactique. Les résultats de ces travaux font l'objet de la présente publication.

## Partie expérimentale

### 1. — *Les échantillons*

L'appellation, la provenance et les aspects sommaires de la flore appréciés en microscopie optique des échantillons ont été présentés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

*Identification et aspects microscopiques des échantillons de vins valaisans examinés*

| Date de prélèvement | Appellation | Origine | Levures | Bacilles | Pédiocoques | Leuconostocs |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 déc. 1976 | Fendant | Conthey 1 | ++ | ++ | + | ++ |
| | | Conthey 2 | ++ | (+) | (+) | ++ |
| | | Chamoson 1 | ++ | — | ++ | — |
| | | Chamoson 2 | ++ | — | — | ++ |
| | | Martigny | ++ | — | ++ | — |
| | Riesling × Sylvaner | Chamoson 3 | ++ | + | + | + |
| | Johannisberg | Chamoson 4 | ++ | (+) | (+) | ++ |
| | | Chamoson 5 | ++ | + | (+) | + |
| | Pinot noir | Chamoson 6 | ++ | ++ | — | — |
| | Gamay | Fully | ++ | ++ | — | — |
| | | Chamoson 7 | + | ++ | — | — |

++ = Très abondant.
\+ = Abondant.
(+) = Rare.
— = Absent.

## 2. — *Microbiologie*

### 2.1. — *Milieu d'enrichissement pour les* L. oenos

Après fermentation d'un moût de Chasselas non sulfité, (mais n'importe quel moût convient; un moût de vin blanc se prête mieux à l'observation de la croissance bactérienne) le vin était clarifié par centrifugation. On y ajoutait 5 g /l de fructose et 40 mg /l d'actidione. Le pH était ajusté à 3,30 par de l'acide malique. Le milieu était alors stérilisé par filtration stérile sur Millipore (∅ 0,45 μ, puis ∅ 0,20 μ). Nous avons pu démontrer qu'une filtration sur filtre à pores de ∅ 0,45 μ était déjà suffisante pour débarrasser le vin de l'ensemble des espèces contaminantes. Plus tard, nous avons supprimé l'apport de fructose sans changer de façon appréciable les propriétés du milieu.

### 2.2. — *Milieu d'isolement pour les* L. oenos

Après passages sur milieu d'enrichissement, les *L. oenos* étaient isolés sur MRS (De Man *et al.*, 1960) agarisé, additionné de 0,5 p. 100 de fructose. Le pH en ce milieu était ajusté à 5,0 par de l'acide malique.

### 2.3. — *Milieu de culture pour les* L. oenos

Après isolement, les *L. oenos* étaient repiqués dans le même milieu que celui utilisé pour leur enrichissement, mais sans actidione. Plus tard, nous y avons également supprimé l'adjonction de fructose, sans remarquer de différences significatives.

### 2.4. — *Inoculation-Incubation*

Lors des enrichissements, les tubes inoculés à 10 p. 100 étaient incubés à 30° en jarres anaérobies sous $CO_2$ (système Gaspak de BBL) durant 10 jours.

Lors des isolements, les boîtes de Pétri étaient incubées selon le même système, à 30 °C, 10 jours.

Lors des repiquages, les tubes inoculés à 10 p. 100 étaient incubés dans une armoire normale à 30 °C jusqu'à développement optimal.

### 2.5. — *Fermentations des sucres*

Nous avons utilisé du MRS sans sucre à pH 4,50 comme milieu de base, additionné séparément de 1 p. 100 de xylose, arabinose, fructose, glucose, galactose et saccharose. Nous avons évalué la croissance bactérienne par mesure de la DO et la production de gaz en l'emprisonnant dans des cloches de verre disposées au fond des tubes à essais. La durée de chaque test était de 20 jours. Les résultats ont été notés après 3, 10 et 20 jours. Nous n'avons pas tenté de préciser si le dégagement de gaz provenait d'une fermentation couplée des citrates présents dans le MRS.

### 2.6. — *Fermentation malolactique* (FML)

L'évolution de cette fermentation était suivie par chromatographie sur couches minces de cellulose selon Maret et Sozzi (1977).

2.7. — *Température de croissance optimale*

Les souches ensemencées en MRS à pH 4,50 et en milieu de culture (cf. 2,3) étaient mises à incuber dans un appareil permettant l'établissement d'un gradient de température. La croissance de microorganismes (MO) en fonction des diverses températures était évaluée par mesure de la transmission à 540 nm. Les progrès de la fermentation malolactique ont également été suivis par chromatographie en couche mince.

2.8. — *pH de croissance optimal*

Les souches étaient ensemencées en MRS et en milieu de culture au vin à différents pH. La croissance des MO était évaluée par mesure de la transmission à 540 nm.

2.9. — *Résistance au $SO_2$*

Les souches étaient cultivées en milieu au vin additionné de 20, 50, 100 mg/l de $SO_2$. La croissance des MO était évaluée par mesure de la transmission à 540 nm et la fermentation malolactique suivie par chromatographie sur couche mince.

2.10. — *GC p. 100*

Les souches étaient cultivées en MRS à pH 4,50.

L'ADN bactérien était préparé selon la méthode de Marmur (1961). La détermination du p. 100 en G + C était effectuée par la mesure du Tm selon Marmur et Doty (1962) et Ferragut et Leclerc (1976), en utilisant la formule de De Ley (1970). Les analyses ont été réalisées à l'aide du Temperature programmer SP 876 de Pye Unicam.

2.11. — *Microscopie optique*

Les échantillons étaient étalés sur une lame, fixés à la chaleur et observés après coloration au bleu de méthylène.

2.12. — *Microscopie électronique*

Pour l'examen de surface au microscope électronique à balayage, les bactéries étaient concentrées par centrifugation à 1 650 g pendant 5 min, dans du tampon phosphate (0,1 M à pH 7,2), puis fixées par du glutaraldéhyde 3 p. 100 dans le même tampon pendant 15 h à 2 °C. Après plusieurs lavages effectuées par agitation dans le tampon phosphate et récupération par centrifugation, les bactéries étaient transférées dans des portes-objets concaves, recouvertes par un filtre Millipore, puis déshydratées dans l'éthanol. La dessiccation était faite par la méthode du point critique dans du $CO_2$ (95 atm., 47 °C). Le filtre était ensuite enlevé et une fine couche d'or était déposée par pulvérisation cathodique. Les échantillons étaient examinés dans un microscope électronique à balayage Cambridge Stereoscan S 4-10, à une tension d'accélération de 30 KV.

## Résultats et discussion

### 1. — *Essais d'enrichissement*

A partir de tous les échantillons considérés, il a été possible d'obtenir des cultures pratiquement pures de *L. oenos* après 2 ou 3 repiquages sur milieu d'enrichissement. Il ne substitait que quelque contamination levurienne insignifiante.

La présence d'actidione et l'incubation en atmosphère de $CO_2$ étaient très utiles pour diminuer le développement des levures et supprimer celui des Acetobacter.

Les échantillons Chamoson 1 et Martigny étaient, au départ, des vins malades peuplés presque exclusivement de pédiocoques. Leurs pH étaient élevés, respectivement de 3,40 et 3,60. Après repiquage en milieu d'enrichissement (pH 3,30) les pédiocoques devaient rapidement disparaître au profit des seuls leuconostocs.

Les échantillons Chamoson 6, Fully et Chamoson 7 étaient colonisés essentiellement par des lactobacilles. Après repiquages en milieu d'enrichissement, les formes bacillaires disparaissaient pour faire place aux leuconostocs. Les pH de ces vins étaient également élevés, respectivement de 3,50, 3,45 et 3,70. Mais ces vins, par ailleurs, ne présentaient aucun défaut de goût marqué.

L'ajustement du pH du vin à 3,30 déterminait de façon remarquable la domination écologique des leuconostocs. Nous rejoignions en cela les conclusions de l'ensemble des travaux de Vetsch (1973), Mayer (1974) et Tanner et Sandoz (1974) de la station fédérale de recherches de Wädenswil (Suisse).

### 2. — *Essais d'isolement*

Après enrichissement, les leuconostocs étaient facilement isolés après 10 jours d'incubation sous $CO_2$ en MRS agarisé. Ils y formaient de très petites colonies. Ces colonies repiquées dans du milieu de culture se développaient plus ou moins rapidement effectuant la fermentation malolactique en un laps de temps variant de 7 à 15 jours selon les clones isolés. Les souches purifiées se développaient également relativement bien en MRS liquide à pH 4,50.

Ces différences d'allure de courbe de développement pouvaient signifier aussi bien qu'il s'agissait de souches différentes dès le départ que de clones mutants dérivés d'une même souche originelle.

### 3. — *Culture des souches isolées*

Les souches isolées se laissaient facilement cultiver dans le milieu au vin à pH 3,30. Nous les avons lyophilisées à partir de ce milieu additionné de lait stérile. Ces préparations ayant été réactivées dans le milieu de culture, les souches testées s'y sont développées à nouveau sans problème. Régulièrement repiquées en MRS liquide, les souches avaient nettement tendance, avec le temps, à perdre leur capacité de développement en milieu au vin.

Les souches retenues après isolement, en raison surtout de leur bonne croissance dans le vin, ont été regroupées dans le tableau 2. Nous y avons inclus une souche de *L. oenos* isolée de Pinot noir et une isolée d'Aligoté lors d'une précédente étude.

Dans les premiers temps de ce travail, nous avons perdu la souche *L. oenos* isolée de Pinot noir (Chamoson 6).

TABLEAU 2

Leuconostoc oenos *isolés des divers échantillons de vins valaisans étudiés*

| Code | Échantillon d'origine |
|---|---|
| Lco 1 [a] . . | |
| Lco 2 . . . . | Gamay - Fully |
| Lco 3 . . . . | Johannisberg - Chamoson 4 |
| Lco 4 . . . . | Fendant - Conthey 1 |
| Lco 5 . . . . | Fendant - Chamoson 1 |
| Lco 6 . . . . | Johannisberg - Chamoson 5 |
| Lco 7 . . . . | Fendant - Conthey 2 |
| Lco 9 [b] . . . | |
| Lco 10 . . . . | Fendant - Chamoson 2 |
| Lco 11 . . . . | Gamay - Chamoson 7 |
| Lco 12 . . . . | Riesling × Sylvaner - Chamoson 3 |
| Lco 13 . . . . | Fendant - Martigny |

[a] Isolé de Pinot noir (1975) à Fully lors d'une étude antérieure.
[b] Isolé d'Aligoté (en 1976) à Chamoson lors d'une étude antérieure.

### 4. — *Fermentations sucrées*

Neuf souches de *L. oenos* (Lco) — les plus faciles à cultiver — ont été testées en milieu spécial (2,5). Les résultats ont été présentés dans le tableau 3. Nous avons également essayé de passer quelques souches de *L. oenos* sur API test (MARET et SOZZI, 1976). Seuls Lco 1 et Lco 11 ont donné un faible développement positif sur les caractères 12 et 25 (fructose + et esculine +).

Notre test en milieu spécial a montré que le sucre le plus facilement utilisé était le saccharose puis le glucose et le fructose. Seules deux souches (Lco 1 et Lco 11) pouvaient nettement fermenter l'arabinose.

### 5. — *Fermentation malolactique*

Toutes les souches de *L. oenos* isolées effectuaient la fermentation malolactique en milieu de culture en 10 jours. En repiquage régulier et avec un taux d'inoculation de 10 p. 100 Lco 1 et Lco 11 pouvaient éliminer la totalité de l'acide malique en 5 jours.

### 6. — *Température de croissance optimale*

Le développement des souches Lco 1 et Lco 11 dans le vin et le MRS — pH 4,5 en fonction de la température a été schématisé par les figures 1 et 2. La température de croissance optimale se situait entre 25 et 30 °C, mais les valeurs à 7 jours montraient que les leuconostocs pouvaient se développer relativement bien entre 16 et 20 °C. Les mesures révélaient une croissance beaucoup plus luxuriante dans

TABLEAU 3

*Fermentation de divers sucres par 9 souches de* L. oenos *isolés de vins valaisans*

| Souches | Saccharose | | | Glucose | | | Fructose | | | Galactose | | | Arabinose | | | Xylose | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | J + 3 | J + 10 | J + 20 | J + 3 | J + 10 | J + 20 | J + 3 | J + 10 | J + 20 | J + 3 | J + 10 | J + 20 | J + 3 | J + 10 | J + 20 | J + 3 | J + 10 | J + 20 |
| Lco 1 . . . . . | + | ++ | +++ G | — | + | ++ G | — | + | ++ G | — | — | — | — | + | ++ | — | — | — |
| Lco 2 . . . . | — | + | + | — | + | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Lco 6 . . . . . | — | + | + | — | + | + | — | + | + G | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Lco 7 . . . . . | — | + | + | — | — | + | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Lco 9 . . . . . | — | + | + | — | + | + | — | + | + G | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Lco 10 . . . . . | — | — | + — | — — | — | + — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Lco 11 . . . . . | + | ++ | +++ G | — | + | + | — | + | +++ | — | — | — | — | + | +++ | — | — | — |
| Lco 12 . . . . . | — | + | + | — | + | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Lco 13 . . . . . | — | + | + | — | + | + | — | + | + G | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

+, ++, +++ : Croissance faible, bonne, très bonne; — : croissance nulle; G : production de gaz nettement décelable.

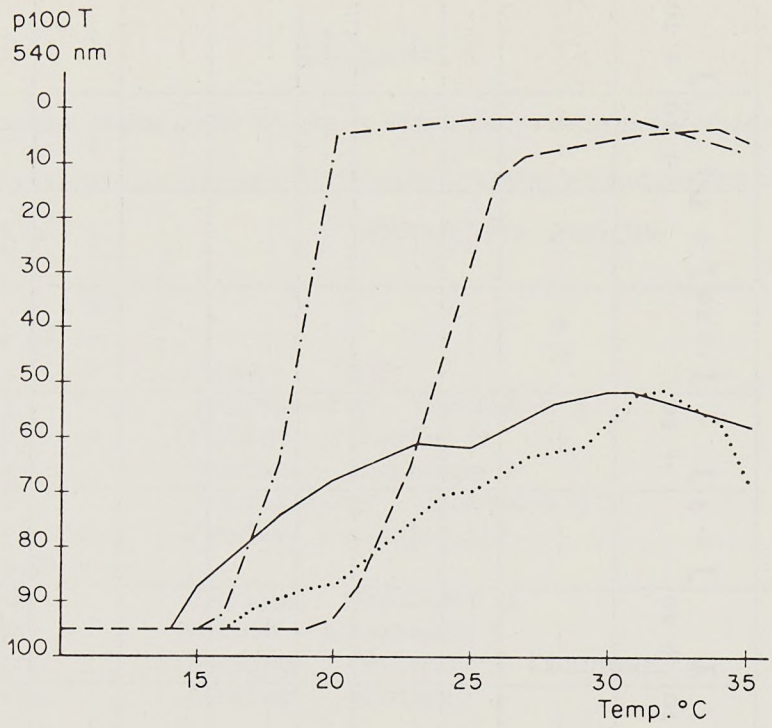



FIG. 1. — *Développement du* L. oenos *Lco 1 en MRS à pH 4,5, après 3 jours* (— — —) *et 7 jours* (—.—.—) *et en vin, après 3 jours* (. . . . . ) *et 7 jours* (———) *d'incubation à différentes valeurs de température. % T à 540 nm.*

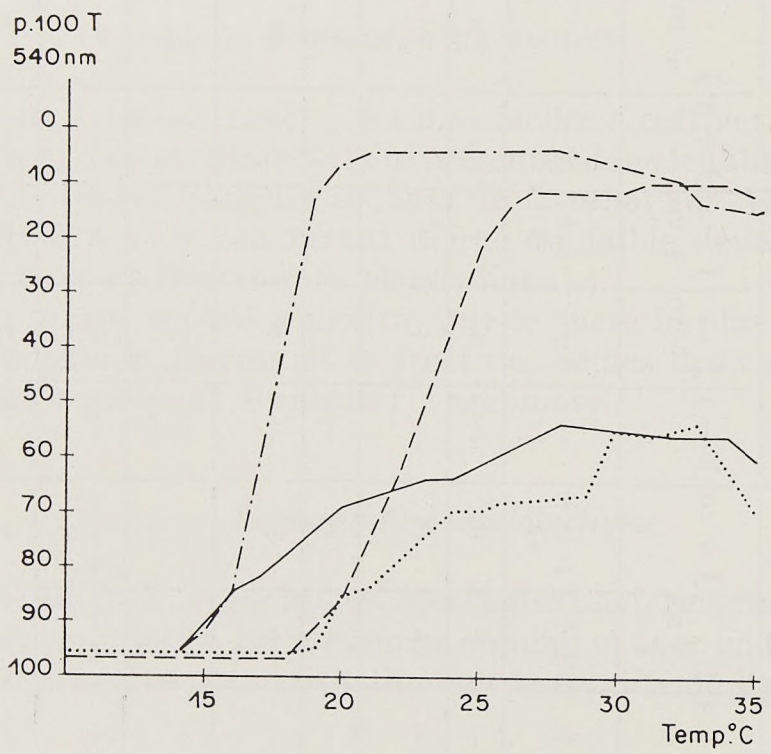



FIG. 2. — *Développement du* L. oenos *Lco 11 en MRS à pH 4,5, après 3 jours* (— — —) *et 7 jours* (—.—.—) *et en vin, après 3 jours* (. . . . . ) *et 7 jours* (———) *d'incubation à différentes valeurs de température. % T. à 540 nm.*

le MRS que dans le vin. La fermentation malolactique à 7 jours n'était complète qu'à partir de 16 °C. Dans l'un et l'autre milieu, la population des leuconostocs atteignait ~ $10^7$-$10^8$ germes vivants /ml vers la fin de la fermentation malolactique.

### 7. — *pH de croissance optimal*

Le développement de diverses souches de *L. oenos* en fonction du pH dans du MRS et dans du vin (milieu de culture) a été présenté par les figures 3 et 4. Le pH optimal se situait vers 4,50 en MRS et 3,0 à 4,50 dans le vin. Cette différence provenait peut-être du fait qu'en acidifiant le MRS, certaines composantes du milieu précipitaient et étaient éliminées par centrifugation-filtration.

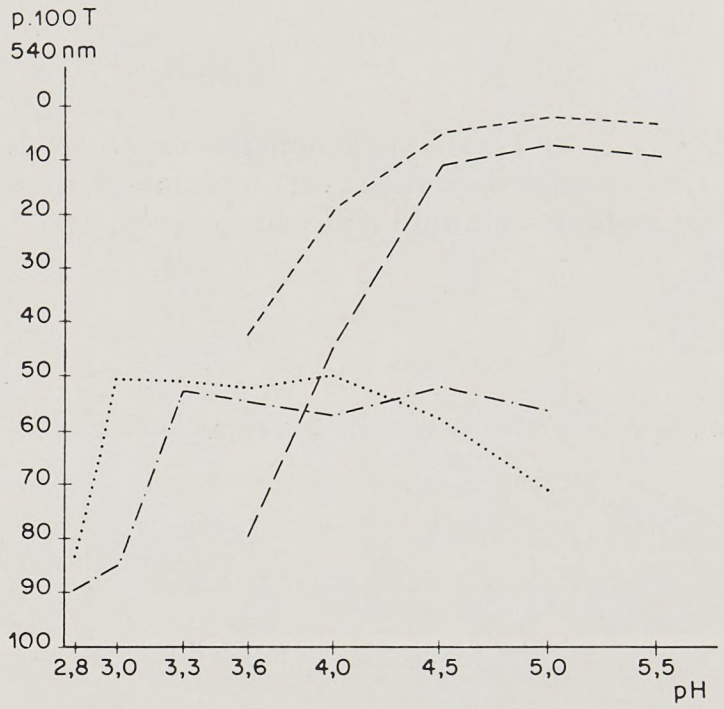



FIG. 3. — *Développement des* L. oenos *Lco 1, en MRS* (— — —) *et en vin* (. . . . . .) *et du Lco 2, en MRS* (———) *et en vin* (—.—.—), *après 6 jours d'incubation à différentes valeurs de pH. % T. à 540 nm.*

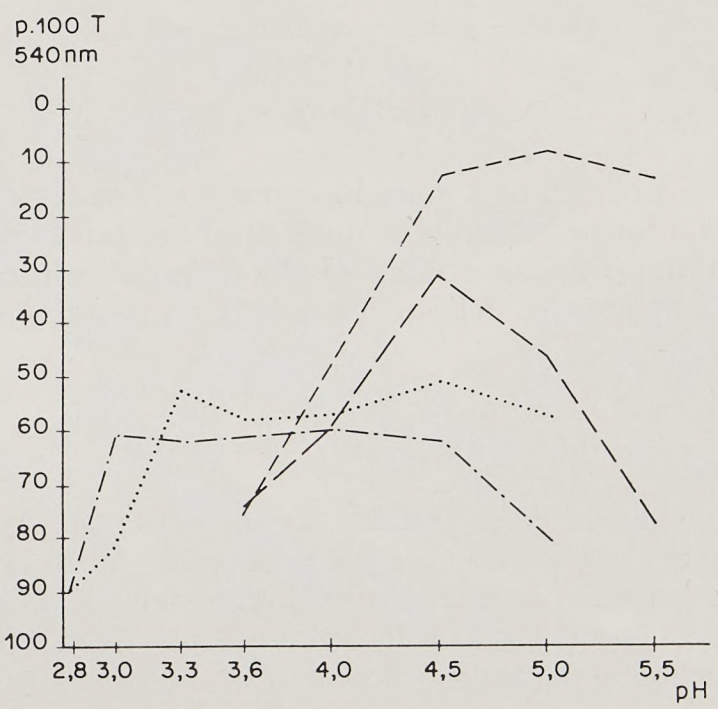



FIG. 4. — *Développement des* L. oenos *Lco 12 en MRS* (— — —) *et en vin* (. . . . . .) *et du Lco 13 en MRS* (———), *et en vin* (—.—.—), *après 6 jours d'incubation à différentes valeurs de pH. % T. à 540 nm.*

### 8. — *Résistance du $SO_2$*

Les 5 souches testées (Lco 1, 2, 7, 11 et 13) se comportaient de la même manière, tant dans les témoins sans $SO_2$ que dans les variantes ayant reçu une adjonction de 20 et 50 mg /l de $SO_2$. 100 mg /l de $SO_2$, par contre, inhibaient toutes les souches testées et la FML n'avait pas encore débuté 11 jours après l'inoculation à l'exception de la souche Lco 7 qui l'avait accomplie à 90 p. 100 à la même époque.

### 9. — *GC p. 100*

Les teneurs en G + C de l'ADN de 8 souches de *L. oenos* ont été présentées dans le tableau 2. Les valeurs obtenues correspondaient à celles indiquées dans la dernière édition du Bergey's Manual à savoir 39-40 p. 100.

TABLEAU 4

*GC p. 100 de l'ADN de 8 souches de* L. oenos *isolés de vins valaisans*

| Code | GC % |
|---|---|
| Lco 3 . . . . . | 38,30 |
| Lco 4 . . . . . | 39,90 |
| Lco 6 . . . . . | 42,40 |
| Lco 7 . . . . . | 41,30 |
| Lco 9 . . . . . | 37,60 |
| Lco 10 . . . . . | 38,40 |
| Lco 11 . . . . . | 40,00 |
| Lco 12 . . . . . | 41,10 |

### 10. — *Microscopie optique*

Les *L. oenos* se présentaient sous la forme de longues chaînettes de diplocoques très petits. La forme ronde des coques était surtout caractéristique et régulière quand les microorganismes étaient observés après culture en milieu synthétique (MRS). Dans le vin, les cellules prenaient un aspect à la fois coccique et bacillaire.

### 11. — *Microscopie électronique*

La morphologie de diverses souches de *L. oenos* observées au microscope électronique à balayage a été présentée par les figures 5 et 6. Les deux photocopies de la figure 5 représentaient le même microorganisme : le *L. oenos* Lco 1 cultivé en MRS à pH 4,5 (1) et en vin (2). Les deux photocopies de la figure 6 représentaient également un même microorganisme, le *L. oenos* Lco 12 cultivé en vin (3) et en MRS (4). Dans les deux cas, on pouvait observer un dimorphisme frappant. Les *L. oenos* cultivés en vin prenaient des formes allongées (jusqu'à 12 µm) sans modification de diamètre des cellules (0,5 µm). La formation des septa semblait se faire

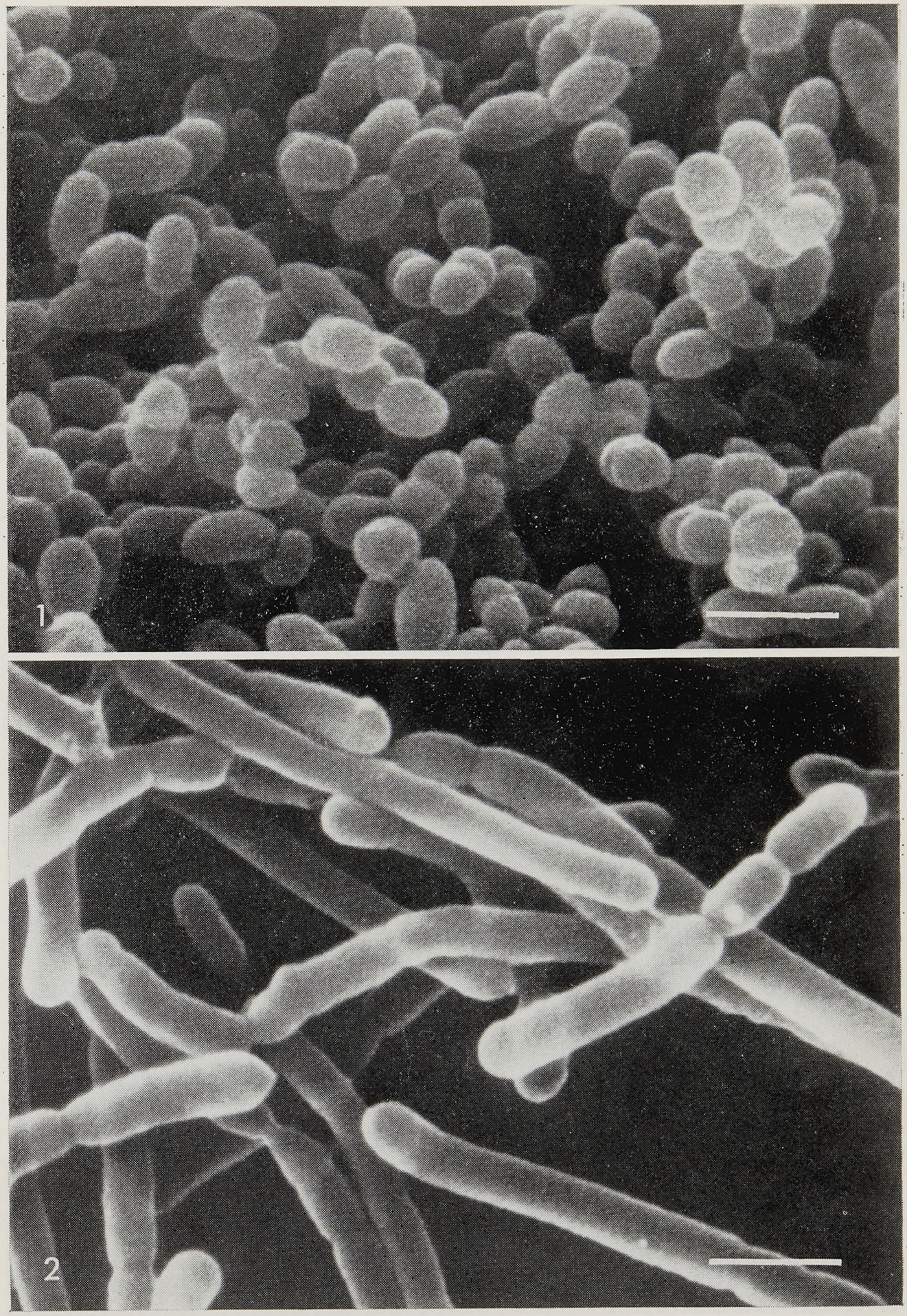
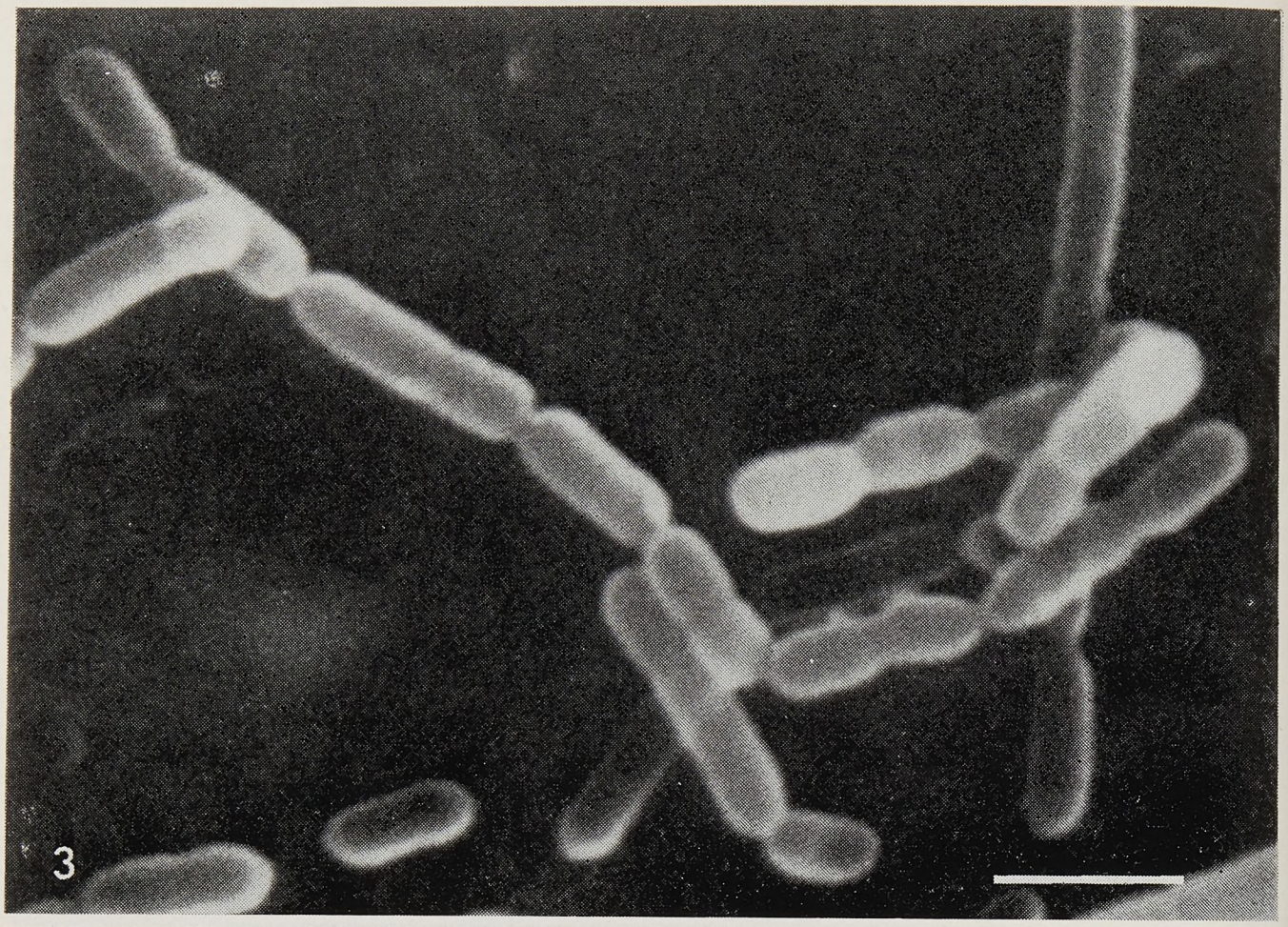



FIG. 5.

1 L. oenos *Lco 1 cultivé en MRS liquide. Micr. électronique à balayage* × *18 500* (— = 1 µm).
2 L. oenos *Lco 1 cultivé en vin. Micr. électronique à balayage* × *18 500* (— = 1 µm).



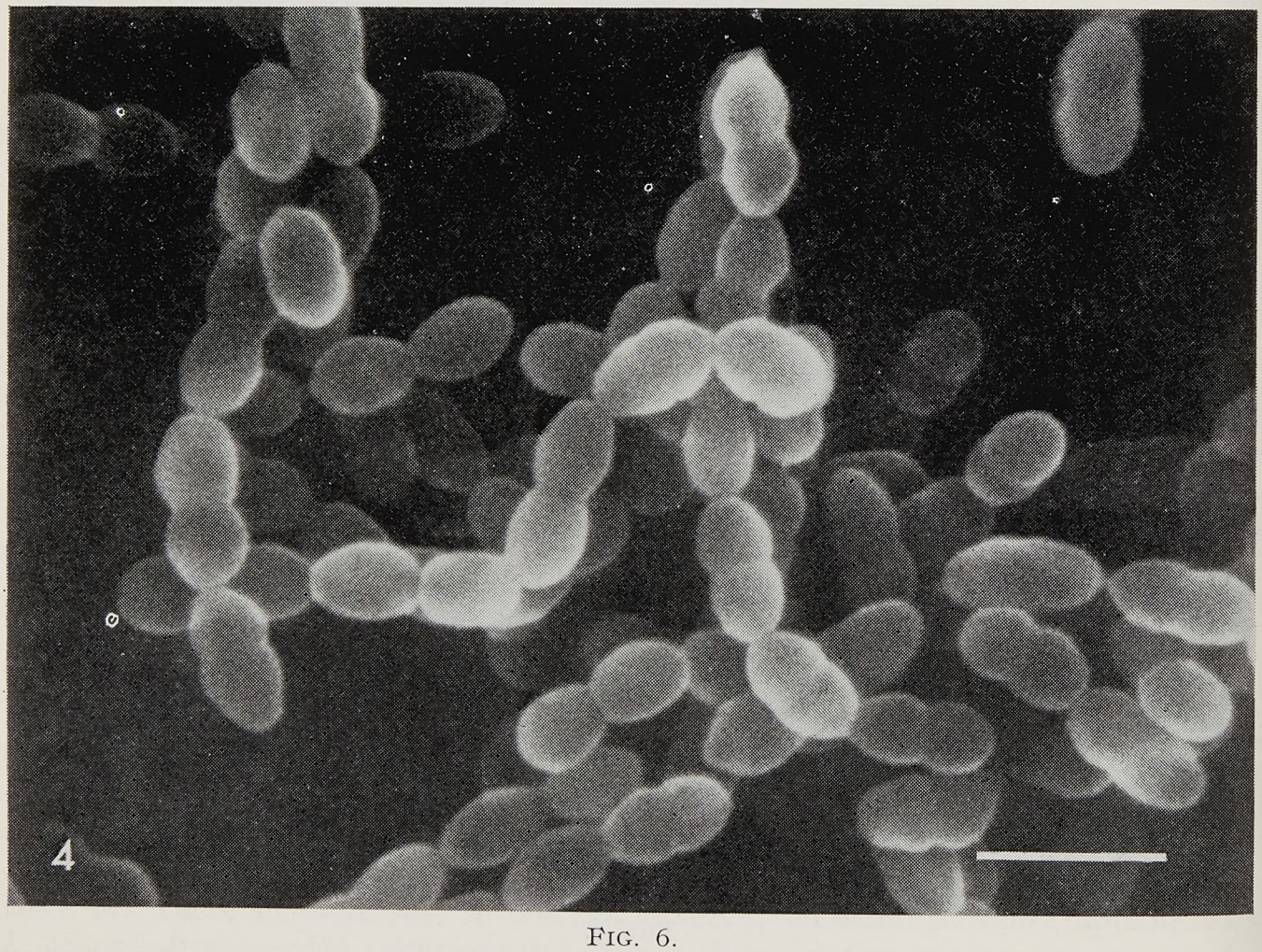




FIG. 6.

3 L. oenos *Lco 13 cultivé en vin. Micr. électronique à balayage* × *18 500* (— = 1 μm).
4 L. oenos *Lco 13 cultivé en MRS liquide. Micr. électronique à balayage* × *18 500* (— = 1 μm).

au hasard et les diverses formes cocciques et bacillaires pouvaient ainsi coexister dans une même préparation.

Les formes cocciques avaient des dimensions assez semblables (environ 0,5 à 1 µm). Ce phénomène expliquait la difficulté d'interprétation d'observations réalisées au microscope optique qui donnaient souvent l'impression d'une culture de coques contaminée par des lactobacilles.

## Conclusions

La série d'études que nous avons effectuées sur des vins du Canton du Valais (Suisse) où la seconde fermentation, dite aussi « rétrogradation », la fermentation malolactique, est considérée comme une nécessité œnologique impérative, a montré que parmi les nombreux microorganismes présents au départ dans le moût, bien peu traversaient les étapes de la vinification pour parvenir enfin à provoquer les processus de désacidification biologique.

Parmi les lactobacilles, ceux qui étaient les plus résistants étaient des *L. hilgardii*. Certains pédiocoques également s'adaptaient très bien aux difficiles conditions du milieu vinaire.

Nous avons observé que nombre de ces vins valaisans blancs ou rouges avaient un pH souvent naturellement élevé, ce qui favorisait dans une certaine mesure le développement des lactobacilles et des pédiocoques. Mais nous avons pu observer que c'était dans ces deux groupes de microorganismes que se recrutaient les plus dangereux responsables des maladies bactériologiques de ces vins, rejoignant en cela les observations de l'œnologie classique. Or il n'est pas rare que, dans cette région, l'on conseille encore parfois une légère désacidification chimique du vin pour favoriser le déclenchement d'une fermentation malolactique lente à se faire. Comme ces désacidifications à la chaux entraînent une élévation de pH, le danger de favoriser des germes dangereux s'en trouve accru d'autant, ce qu'ont très bien démontré les chercheurs de Wädenswil (Suisse) (Vetsch, 1973; Mayer K., 1974; Tanner et Sandoz, 1974, etc.).

Il serait beaucoup plus avantageux, dans le cas d'une fermentation malolactique difficile, de tout faire pour favoriser le développement des *L. oenos* qui sont certainement les microorganismes les mieux adaptés au milieu vinaire et surtout aux milieux vinaires les plus acides.

Ce travail indique les moyens d'isoler systématiquement les *L. oenos*, de les maintenir actifs en culture et prêts à entrer dans la composition de starters industriels contrôlés.

Les *L. oenos* sont les seuls microorganismes capables de se développer dans les vins à haute acidité titrable pour les désacidifier biologiquement sans risque de faire apparaître des défauts organoleptiques graves. Les lactobacilles aussi bien adaptés que les *L. oenos* sont rares et sont souvent à l'origine de défaut de goût. Ils perdent également souvent en culture leur capacité de se développer dans le vin et sont donc beaucoup plus instables.

Mais nous avons également pu observer que certaines souches de *L. oenos* sont plus faciles à cultiver que d'autres. Elles devraient aussi se différencier par des propriétés aromatiques spéciales. Certaines seraient peut-être plus adaptées à tel type de vin que d'autres. La maîtrise de la fermentation malolactique des vins où elle est nécessaire impliquerait donc non seulement l'utilisation des microorganismes bien adaptés au milieu vinaire, mais également choisis en fonction des

caractères particuliers des divers crus. Dans cette optique, il n'est pas exclu que certaines associations levure-leuconostoc, ou levure-leuconostoc-lactobacilles permettraient d'atteindre de meilleurs résultats que d'autres choisies au hasard. En tout cas, ces questions se poseraient avec une acuité nouvelle dans les perspectives d'une œnologie à utilisation de $SO_2$ minimale ou sans $SO_2$ qui impliquerait la maîtrise bactériologique des processus de vinification.

*Reçu pour publication en décembre 1978.*

## Remerciements

Nous remercions notre collaborateur, M. N. d'Amico, non seulement de la grande part qu'il a prise dans la réalisation technique de ce travail, mais aussi de l'importance de plusieurs observations ayant permis une approche nouvelle de maints problèmes.

Nos remerciements vont également à notre collaboratrice, M^lle G. Brondin.

## Summary

*Malolactic flora of musts and wines from the Canton of Valais (Switzerland)*
III. — *The leuconostoc*

From all the Valaisan wines studied it was possible to isolate *L. oenos* strains. The methods we used allowed us to isolate systematically, to cultivate and to preserve these microorganisms. Temperatures and pH value at optimal growth, sugar fermentations, $SO_2$ tolerance and G + C content of DNA were also examined.

Optical and electronical microscopic examinations showed a dimorphism between the *L. oenos* cultivated in synthetic medium as compared to wine medium.

In conclusion, we considered that *L. oenos* was the more effective microrganism with the heterofermentative lactobacilli (*L. hilgardii* and *L. brevis*) in the biological desacidification in wines studied.

## Références bibliographiques

De Man J. S., Rogosa M., Sharpe E., 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. App. Bact.*, **23**, 130-135.

De Ley J., 1970. Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J. Bact.*, **101**, 738-754.

Ferragut C., Leclerc H., 1976. Étude comparative des méthodes de détermination du Tm de l'ADN bactérien. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur), **127** A, 223-235.

Maret R., Sozzi T., 1977. Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais-Suisse. I. Lactobacilles et pédiocoques. *Ann. Tecnol. agric.*, **27**, 255-273.

Maret R., Sozzi T., 1978. Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais-Suisse. II. Évolution des populations de lactobacilles et de pédiocoques au cours de la vinification d'un vin blanc (un Fendant) et d'un vin rouge (une Dôle). *Ann. Technol. agric.* (en préparation).

Maret R., Sozzi T., 1976. Flore lactique de fromageries d'alpages suisses. *Le Lait*, **56**, 555-556.

MAYER K., 1974. Nachteilige Auswirkungen auf die Warenqualität bei ungünstig verlaufenem biologischen Säureabbau. Schweiz. *Zeitschrift für Obst- und Weinbau*, **110**, 385-391.

MARMUR J., 1961. A procedure for the isolation of deosyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218.

MARMUR J., DOTY P., 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Bio.*, **5**, 109-118.

TANNER H., SANDOZ M., 1974. Chemische Entsäuerungsmassnahmen im Hinblick auf die Einleitung eines einwandfreien biologischen Säureabbaues. Schweiz. *Zeitschrift für Obst- und Weinbau*, **110**, 356-367.

VETSCH V., 1973. Untersuchungen zur Vermehrung von Bacterium gracile (Leuconostoc oenos) während des biologischen Säureabbaues im Wein. Schweiz. *Zeitschrift für Obst- und Weinbau*, **109**, 468-479.

*Ann. Technol. agric.* 1979, **28** (1), 57-77.

# Stockage de haricots secs (*Phaseolus vulgaris*) : Evolution de leur microflore, de leur faculté germinative et de leur qualité technologique en fonction de caractéristiques de stockage

A. CAULLIEZ, Jeanne POISSON, Henriette DROUET(*) et Marie-José CHARPENTIE(**)

(*) *Laboratoire de Recherches de la Chaire de Pathologie Végétale, I.N.A., 16, rue Claude-Bernard, 75005 Paris*

(**) *Laboratoire de Cryptogamie du M.N.H.N., 12, rue Buffon, 75005 Paris*

## Résumé

L'industrialisation croissante du stockage des haricots secs et les nouvelles modalités de leur commercialisation de détail nécessitent une meilleure connaissance des conditions de stockage compatibles avec une conservation satisfaisante des graines.

L'étude de l'évolution de la microflore des haricots secs (Phaseolus vulgaris) au cours du stockage ainsi que l'étude de l'évolution concomitante de leur faculté germinative et de leurs caractéristiques technologiques ont donc été abordées.

Pour cela des essais de stockage de flageolets de bonne, médiocre et mauvaise qualité (variété Ardent) (teneur en eau après battage : 13,5 p. 100) ont été effectués en atmosphère non renouvelée, à 7 °C et 20 °C sous des humidités relatives (HR) de 85 p. 100 et 65 p. 100.

Les courbes isohydres d'évolution des moisissures, de la faculté germinative et les tests technologiques (rendements après traitement industriel, qualités organoleptiques) ont permis de préciser des durées de bonne conservation des haricots secs (sous HR 85 p. 100 à 20 °C, elles sont de 2 à 3 mois d'après le critère faculté germinative, de 4 mois d'après le critère microbiologique, et au moins égales à 5 mois d'après les critères organoleptiques. Sous HR 65 p. 100 elles sont supérieures à 10 mois). Les durées de conservation sont d'autant plus longues que les températures sont plus basses, et la qualité initiale des haricots meilleure.

Les résultats microbiologiques obtenus à partir de la méthode des dilutions-ensemencements permettent de donner une appréciation sur la qualité des haricots plus en accord avec la valeur de la faculté germinative et les qualités organoleptiques que les résultats obtenus avec les méthodes d'Ulster.

Au cours des essais *Botrytis cinerea* régresse dans tous les lots, mais d'autant plus lentement que le stockage est effectué dans de meilleures conditions : soit à basse température, sous une faible humidité relative.

Mots clés : *haricots secs, Phaseolus vulgaris, stockage, microflore, faculté germinative, qualité technologique.*

## Introduction

Dotées d'une bonne valeur nutritionnelle, les graines de haricot constituent une source non négligeable de protéines alimentaires; de plus, certaines variétés, comme les flageolets, très demandées pour l'exportation, présentent un intérêt économique certain.

Depuis quelques années, on assiste à une véritable industrialisation du stockage du haricot, ce qui tend à rendre les problèmes de conservation de plus en plus importants. Or, il n'existe que fort peu de renseignements qui leur soient spécifiques. Pourtant, au cours du stockage, les graines de haricot peuvent être soumises à divers facteurs susceptibles d'entraîner leur dégradation. C'est ainsi que dans les entrepôts, comme au niveau de la commercialisation, les risques de détérioration d'origine microbienne ne sont pas à écarter, leur amplitude pouvant varier selon le milieu environnant en fonction de la température et de l'humidité relative, voire même selon le conditionnement (ensachage jute ou plastique, ensachage cartonné ou papier).

C'est pour ces raisons que le présent travail a été entrepris, il doit être considéré, avant tout, comme un sondage préliminaire sur l'évolution de la flore saprophyte et pathogène du haricot-grain en cours de stockage, et sur l'évolution concomitante de la faculté germinative et des caractères organoleptiques. L'étude a été effectuée avec une nouvelle variété de flageolets (variété Ardent) résistante aux races les plus communes d'Anthracnose et à la graisse, mais non au *Botrytis*; les essais de stockage ont été réalisés à 20 °C et 7 °C en atmosphère non ventilée, sous des humidités relatives de 85 p. 100 et 65 p. 100 (l'une favorable au développement des moisissures et l'autre non).

Les bactéries n'étant pratiquement jamais à l'origine d'accidents de conservation, compte tenu du degré de siccité des graines, ce sont les micromycètes, plus particulièrement les moisissures, qu'il est important de considérer (Multon *et al.*, 1969).

En général sur les graines il existe deux types de mycoflore : l'une dite « du champ » est à tendance phytopathogène (*Botrytis*, *Fusarium*...), l'autre dite « de stockage » s'installe au niveau des aires de stockage (*Aspergillus* et *Penicillium*) (Christensen et Kaufmann, 1968).

Il semble bien qu'il en soit de même pour la mycoflore des haricots bien qu'elle n'aît suscité que fort peu de travaux.

Jordao *et al* (1976) examinant des lots de haricot après récolte, ont trouvé qu'ils renfermaient une quantité assez importante de moisissures (de l'ordre de $6{,}1.10^3$ par gramme, le nombre de bactéries étant de $5{,}6.10^3$). Mais l'importance de la contamination fongique est très variable suivant les cas, c'est ainsi qu'Ellis *et al.* (1976) ont examiné deux lots obtenus chez des agriculteurs : l'un ne renfermait aucune graine contaminée par une mycoflore interne alors qu'il y en avait 88 p. 100 dans l'autre.

Dans ce dernier cas, 23 p. 100 des graines renfermaient des *Fusarium*; 10 p. 100 du *Colletotrichum lindemuthianum*, 7 p. 100 *Phomopsis* sp; 6 p. 100 *Macrophomina phaseolina*, 5 p. 100 *Rhizoctonia solani*, 22 p. 100 *Penicillium spp*, 14 p. 100 *Aspergillus* sp.

De même, effectuant un inventaire de la flore fongique des haricots, Mislivec et Bruce (1977) ont mis en évidence la présence de nombreux genres et espèces de moisissures sur les graines, tels *Alternaria* sp, *Botryosporium* sp, *Cladosporium* sp,

*Fusarium* sp, *Mucor* sp et *Rhizopus* sp, d'une part, *Aspergillus* (*candidus, flavus, glaucus, niger, versicolor*) et *Penicillium* (*brevicompactum, expansum, cyclopium, viridicatum*...) d'autre part, ces derniers étant numériquement dominants.

Enfin, HABISH (1972) caractérise des *Aspergillus flavus* et de l'aflatoxine dans les lots de haricots, il en attribue la présence au fait que le séchage après récolte n'est pas assez rapide.

ELLIS *et al.* (1976) font un rapprochement entre la faculté germinative des haricots et le niveau de leur peuplement microbien en travaillant sur deux lots de semence de haricot, ils rapportent que le lot de mauvaise qualité à forte teneur en microorganismes (88 p. 100 des graines contaminées) n'a qu'une faible faculté germinative de 35 p. 100, alors que le lot à faible teneur en microorganismes a une faculté germinative élevée de 95 p. 100.

En traitant le lot de moindre qualité à l'aide de fongicides (carboxine, captane, benomyl), ils observent une augmentation de la faculté germinative. Ils en concluent que le développement des moisissures de la graine inhibe la germination.

En ce qui concerne le comportement de *Botrytis* sur les graines, CHAMPION (1964), en travaillant sur des semences de tournesol, constate que la fréquence de *Botrytis* va en diminuant au cours du stockage (la vitesse de cette évolution étant corrélée aux variations de l'humidité relative et de la température), et qu'aux températures de 22 °C et 30 °C la diminution du *Botrytis* est parallèle à une augmentation du nombre de colonies des *Penicillium* et plus encore des *Aspergillus*.

D'une façon générale, l'évolution de la microflore des graines est sous la dépendance, entre autres facteurs, des conditions écologiques du stockage : teneur en eau des graines, température et composition de l'atmosphère (CHRISTENSEN et KAUFMANN, 1965). L'isotherme de sorption de vapeur d'eau à 25 °C de la graine de haricot — variété Ardent d'origine française — illustrée par la figure 1 (MULTON, 1978), donne en première approximation des indications sur les conditions hydriques de stockage permettant de maintenir les haricots à l'abri d'un développement microbien (*) : sur des graines stockées en atmosphère libre ou renouvelée et se trouvant en équilibre hydrique avec des humidités relatives élevées, supérieures à 90 p. 100 (pour lesquelles les teneurs en eau des haricots sont supérieures à 22,7 p. 100), les moisissures prolifèrent, aussi bien les moisissures champêtres phytopathogènes (**) que les moisissures de stockage, ainsi que des bactéries et des levures.

Aux humidités relatives de 85 à 90 p. 100 (teneur en eau des haricots de 20 p. 100 et 22,7 p. 100), beaucoup de *Penillium*, d'*Aspergillus*, de *Mucorales* et de *Cladosporium* se développent.

Aux humidités relatives comprises entre 70 et 80 p. 100 (teneur en eau des haricots de 14,4 p. 100 et 17,9 p. 100) les *Aspergillus* prédominent (CHRISTENSEN et KAUFMANN, 1968).

Enfin, aux humidités relatives inférieures à 65,5 p. 100, il y a blocage de toute activité microbienne (teneur en eau correspondante des haricots, 12,4 p. 100).

Cependant, dans la zone hydrique de développement des microorganismes, l'isotherme de sorption de vapeur d'eau de la graine ne fournit pas d'indications

(*) Les valeurs fournies par la figure 1 sont très légèrement supérieures (de 3 p. 100 environ) à celles qui ont été trouvées par JORDAO *et al.* (1976) pour des haricots de la variété Carioquinha, ce qui peut traduire soit une différence entre les caractéristiques de sorption des deux variétés, soit une divergence entre les méthodes de détermination de la teneur en eau.

(**) Aux humidités relatives inférieures à 93 p. 100, le *Botrytis* n'aurait pas de croissance mycélienne et la durée de survie du mycélium serait inférieure à 1 mois (SCHNEIDER et ORELLI, 1912; BROOKS et COOLEY, 1917; ADAIR, 1971).

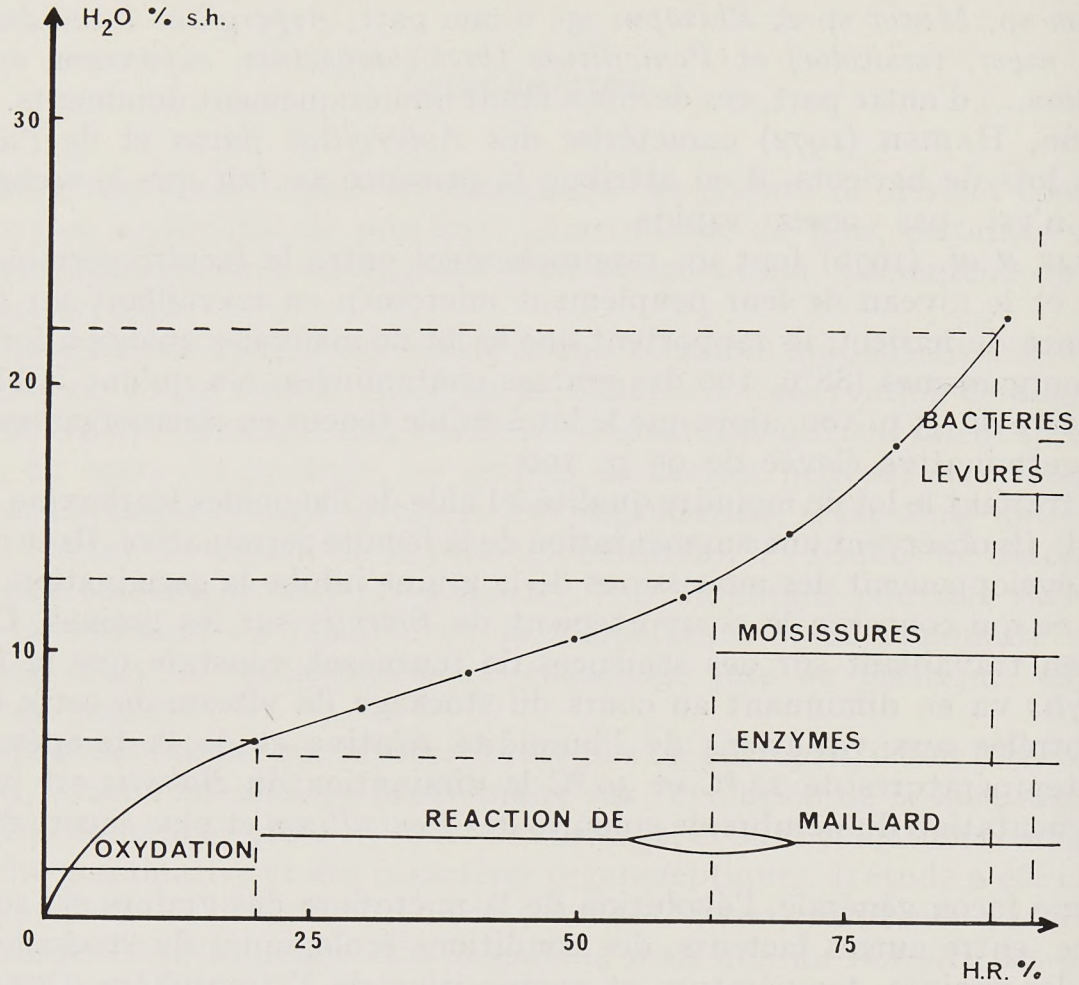



FIG. 1. — *Isotherme de sorption de vapeur d'eau du flageolet à 25 °C, montrant les zones d'influence du facteur humidité relative sur les principales causes d'altération*

sur la vitesse de colonisation des graines par les microorganismes, vitesse dont dépend pourtant la durée de bonne conservation et pour laquelle il ne semble pas y avoir de données expérimentales pour les haricots.

Par contre, l'influence des facteurs d'ambiance sur d'autres critères de la valeur d'utilisation des stocks a retenu l'attention des chercheurs. Ainsi, ZINK *et al.* (1976), en étudiant les effets de plusieurs conditions de stockage sur la longévité, la vigueur, la tenue et le rendement de graines de haricot, constatèrent que de fortes teneurs en eau (14,2 p. 100) et de fortes températures de stockage (30 °C) causent de graves préjudices à la faculté germinative, à la vigueur et au rendement productif des graines. L'effet de la température étant plus prononcé sur les graines à forte teneur en eau que sur les autres. BURR *et al.* (1968), JORDAO *et al.* (1976), en observant à l'échelle industrielle, en silos, l'évolution de l'état des haricots destinés à la consommation, arrivèrent aux mêmes résultats que ZINK *et al.* (1976), à savoir que la préservation de la qualité alimentaire de la graine dépend de la teneur en eau, de la température et de la durée du stockage. Ils soulignèrent, de plus, la nécessité d'une bonne aération pour assurer cette préservation. Mais il n'y a pas eu de lien établi entre l'évolution de la microflore des graines et celle de leur valeur technologique, c'est pourquoi, au cours de cette étude, nous nous sommes attachés à suivre l'évolution de la microflore des graines et l'évolution simultanée des critères de qualité.

## I. — Conditions expérimentales et méthodologie

### A. — *Matériel biologique utilisé et protocole expérimental*

Les haricots mis en expérimentation appartiennent à une nouvelle variété de flageolets (variété : Ardent) résistante à l'anthracnose et à la graisse. Ils ont été fournis par la station de génétique et d'amélioration des plantes de l'I.N.R.A. (Versailles).

Les graines sont issues de cultures faites soit en champs expérimentaux, soit en pépinières.

Un tri des haricots provenant des champs expérimentaux a été effectué afin de les regrouper en lots homogènes qualitativement différents.

Les critères de répartition, basés sur l'aspect général de la graine, correspondent sensiblement à ceux de spécification qui sont donnés dans les textes législatifs actuellement en vigueur pour les haricots destinés à la consommation (Décision ministérielle n° 65 article 5 : « ...les graines doivent être fraîches, saines, de couleur franche, exemptes de taches, non germées, en bon état... » parue au *J. O.* du 7 avril 1972). Il en ressort que, selon ces critères, le stock des graines provenant des champs a été divisé en lots n° 1 et n° 3, le premier étant de qualité supérieure au second.

Le lot n° 2, quant à lui, est constitué des graines issues des pépinières.

Les graines des différents lots sont réparties dans des sachets en mailles de polyamide placés dans des enceintes climatisées maintenues à 20 °C pour les lots 1 et 2, à 20 °C et 7 °C pour le lot n° 3; les humidités relatives (H.R.) de l'air y sont maintenues constantes aux valeurs désirées, à savoir : 65 p. 100 et 85 p. 100 pour chacun des lots; l'atmosphère, quant à elle, est considérée comme « libre », les sachets n'étant ni en récipient hermétiquement fermé, ni sous atmosphère ventilée. Les humidités relatives désirées sont obtenues par mise en équilibre hydrique de l'atmosphère des enceintes avec des solutions saturées de $NH_4NO_3$ à 20 °C, et de $(NO_3)_2Ca$ à 7 °C. pour l'humidité relative de 65 p. 100 et de KCL pour celle de 85 p. 100 (Winston, 1960; Rockland, 1960).

L'étude réalisée, n'étant qu'un sondage, a été limitée à des stockages effectués dans des conditions très différentes : les unes sous une H.R. de 65 p. 100 mettant pratiquement les graines à l'abri d'un développement microbien, les autres sous une H.R. de 85 p. 100 étant au contraire, favorables à la multiplication des microorganismes, notamment à celle des moisissures.

Les températures de 7 °C et de 20 °C correspondent à certaines conditions de la pratique, à savoir que l'entreposage des semences se fait à des températures voisines de 7 °C, et que lors de la commercialisation, les haricots destinés à l'alimentation peuvent rencontrer des températures proches de 20 °C et plus (silos, hangars, moyens de transport, grandes surfaces...).

La durée totale de l'essai de stockage est de 10 mois. Chaque mois, des prélèvements de haricots sont effectués dans chacun des lots pour permettre de suivre l'évolution de leur microflore, de leur teneur en eau, de leur faculté germinative et de leur qualité technologique.

### B. — *Méthodes d'analyse utilisées*

#### 1. — *Dosage de la teneur en eau des graines*

Ce dosage s'effectue par un séchage en étuve à 130 °C pendant 24 heures de 10 grammes de grains entiers de haricot.

La teneur en eau calculée par le rapport :

$R = \frac{(\text{poids frais} - \text{poids sec})}{\text{poids frais}} \times 100$ est exprimée en pourcentage de la substance humide. Les résultats obtenus sont à $\pm$ 0,01 par rapport à ceux de la méthode de référence (à 50 °C sous vide en présence de $P_2O_5$) (GUILBOT *et al.*, 1973).

2. — *Détermination qualitative et quantitative de la microflore des grains de haricot au cours du stockage*

a) *Méthode par broyage des grains en phase liquide*

En l'absence de méthode de référence concernant l'inventaire de la microflore totale (interne et externe) des grains de haricot, le principe de la méthode AFNOR V 08-201 a été adopté pour la préparation de la suspension mère : 100 g de haricots, soit environ 340 grains, sont prélevés puis pesés exactement à 0,1 g près et versés aseptiquement dans un bol mixer (Waring blendor), contenant 400 ml de diluant stérile (NaCl : 9 g; bactopeptone Difco : 1 g; tween 80 : 0,033 g; eau distillée sur verre : q.s.p. 1 000 ml, pH 7). Après 25 minutes de trempage destiné à revivifier les microorganismes et ramollir les grains, ceux-ci sont broyés dans le diluant pendant 1,5 minutes à la vitesse de 12 500 tours/minute.

Le dénombrement des microorganismes en suspension est effectué d'après la méthode des dilutions décimales, suivies d'ensemencement sur milieux de culture en boîte de Pétri (CAHAGNIER *et al.*, 1977).

L'intérêt de cette méthode réside dans le fait qu'elle intègre les évolutions quantitatives des flores internes et externes, des espèces du champ et de stockage et qu'elle permet d'analyser un échantillon important (sans nécessiter beaucoup de matériel de laboratoire) ce qui est statistiquement non négligeable dans le cas de produits hétérogènes.

b) *Méthode dite d'Ulster* (MUSKETT *et* MALONE, 1940) *et méthode d'Ulster modifiée pour l'Analyse Sanitaire des Semences* (1977) *et de leur mycoflore interne.*

100 grains tels quels (dans le premier cas) et 100 grains prétraités par immersion dans l'hypochlorite de sodium à 1° chlorométrique français pendant 10 minutes (dans le deuxième cas), sont déposés sur du milieu de culture en boîte de Pétri à raison de 5 grains par boîte de 10 cm de diamètre. Le milieu de culture (extrait de malt cristallisé : 10 g; agar-agar : 15 g; eau distillée : 1 000 ml; pH 7,0 $\pm$ 0,2) est additionné d'oxytétracycline (cf *a* : dans le cas des grains non désinfectés. Les graines contaminées par des moisissures sont dénombrées après 5-7 et 9 jours d'incubation à 20 °C à l'obscurité.

Par ces 2 méthodes on apprécie l'importance relative de la mycoflore totale (Ulster) et de la mycoflore interne, c'est-à-dire des thalles installés (Ulster modifié), de plus elles donnent des indications qualitatives plus nuancées que la méthode par broyage en permettant de suivre simultanément l'évolution de la microflore du champ et celle de la microflore de stockage, alors qu'en utilisant la méthode par broyage les espèces du champ sont masquées quand les espèces de stockage, beaucoup plus sporulantes, se développent. Mais la méthode par broyage donne la possibilité d'affiner l'expression quantitative des résultats des méthodes d'Ulster

parce qu'elle révèle la progression des moisissures sur les graines pendant beaucoup plus longtemps, même au-delà de la période où il y a 100 p. 100 de graines contaminées.

3. — *Appréciation de la faculté germinative*

a) *Par référence aux règles internationales pour les essais de semences définies par l'I.S.T.A.*(*) *(1976).*

La faculté germinative est exprimée en nombre de germes normaux p. 100 du nombre de graines examinées (400).

b) *Par les méthodes d'Ulster*

La faculté germinative a également été appréciée sur les graines de haricots mises en boîtes de Pétri, lors de l'analyse de la mycoflore par les méthodes d'Ulster, par un dénombrement des graines germées et non germées après 7 jours.

4. — *Tests de qualité technologique utilisés par les industriels*

Le but essentiel de ces tests tels qu'ils sont pratiqués dans l'industrie est d'estimer la valeur d'utilisation des haricots pour l'alimentation (cuisson, conserves) : Les uns consistent à mesurer les « rendements » c'est-à-dire la masse de haricots avant et après différents traitements technologiques, les autres permettent d'apprécier les caractères organoleptiques.

a) *Protocole expérimental pour la mesure des « rendements »*

Les grains de haricots sont tout d'abord pesés (150 g), ce qui donne une valeur de base : le « rendement sec ». Après un trempage en eau froide et douce pendant 12 heures le poids des grains humides donne le « rendement trempé ».

Les grains sont ensuite égouttés pendant 5 minutes sur un tamis (maille ⌀ 5 mm) et mis à cuire pendant 10 minutes à 90-95 °C : c'est la phase de blanchiment après laquelle les grains sont de nouveau pesés pour obtenir le « rendement blanchi ». Enfin les haricots blanchis sont stérilisés en autoclave statique, format 1/2 haut, pendant 20 minutes à 125 °C. La masse des grains stérilisés donne le « rendement stérilisé ».

Le « rendement sec » correspondant à la valeur de référence, chacun des autres rendements est exprimé en fonction de cette valeur. Dans le cas des flageolets, les « rendements » sont considérés comme bons lorsque :

le rendement trempé = 2 fois le rendement sec
le rendement blanchi = 2,1 ± 0,1 fois le rendement sec
le rendement stérilisé = 2,6 ± 0,1 fois le rendement sec

Ce qui, en donnant au « rendement sec » la valeur 100, correspond aux valeurs de 200, 200 à 220, et 250 à 270, pour les rendements trempé, blanchi et stérilisé, respectivement.

b) *Les caractères organoleptiques : le goût, la couleur et le calibre*

Le goût est apprécié à l'aide de notes attribuées par un nombre de goûteurs au palais expert statistiquement significatif.

La couleur et le calibre étant estimés selon les mêmes critères que ceux cités dans le paragraphe relatif à la constitution des lots.

(*) I.S.T.A. : International Seed Testing Association.

## I. — Résultats obtenus et discussion

### A. — *Évolution de la teneur en eau* (fig. 2)

Dans chacun des lots, la teneur en eau augmente au cours du temps : l'équilibre hydrique air-grain est atteint en moins de deux mois sous l'humidité relative de 65 p. 100, la teneur en eau des haricots étant alors proche de 15 p. 100 à 20 °C (sauf dans le lot 3 qui a séché en fin de stockage à cause d'une légère augmentation de température), et un peu supérieure à 15 p. 100 à 7 °C; alors que sous l'humidité relative de 85 p. 100 il n'est atteint qu'au bout de cinq mois, la teneur en eau des haricots étant alors légèrement supérieure à 21 p. 100 à 20 °C, et à 23 p. 100 à 7 °C. Ces valeurs sont supérieures à celles qui sont indiquées par la courbe de sorption 25 °C (fig. 1), ce qui est normal étant donné que pour une même humidité relative la teneur en eau varie à l'inverse de la température.

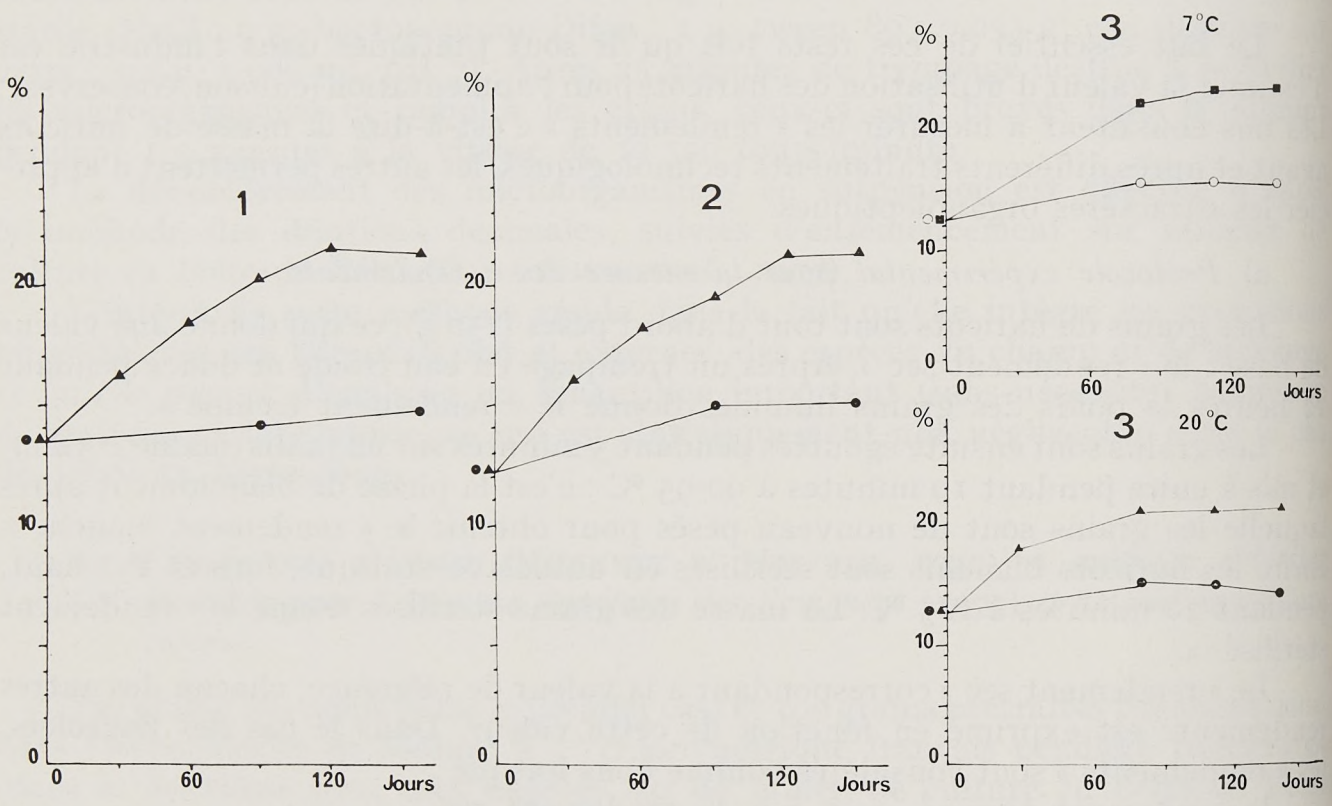



FIG. 2. — *Évolution de la teneur en eau des lots 1, 2 et 3 de haricots au cours des essais de stockage* :
— à 20 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100* ( ▲) *et de 65 p. 100* ( ●),
— à 7 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100* ( ■) *et de 65 p. 100* ( ○).
Abscisse : durée de stockage en jours.
Ordonnée : teneur en eau exprimée en pourcentage de matière humide.

### B. — *Composition et évolution de la microflore*

La microflore des lots de haricots mis en expérimentation comporte essentiellement des bactéries et des moisissures, la présence de levures n'a été mise en évidence que dans le lot n° 3 au début de l'essai.

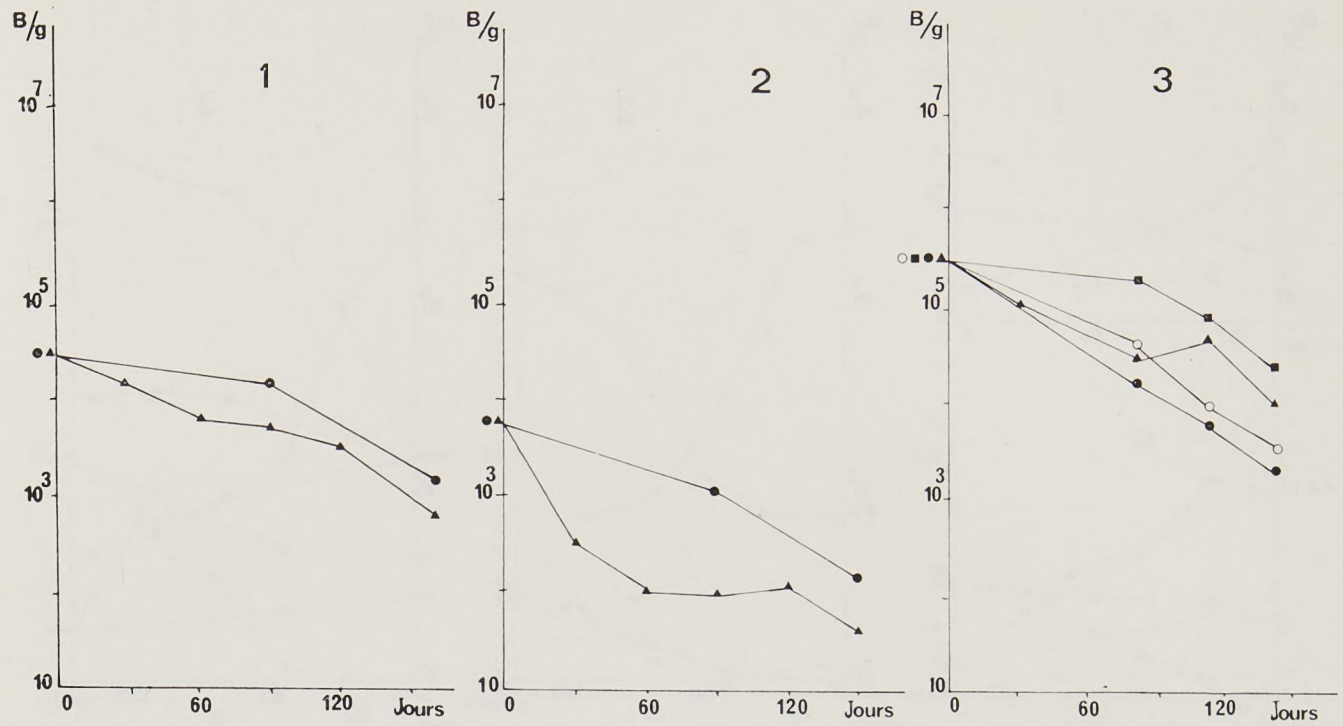



FIG. 3. — *Évolution quantitative des bactéries dans les lots 1, 2 et 3 de haricots au cours des essais de stockage :*
— à 20 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100* (— ▲—) *et de 65 p. 100* (●),
— à 7 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100* (— ■—) *et de 65 p. 100* (○).
Abscisse :durée de stockage en jours.
Ordonnée : nombre de bactéries par gramme de haricot.

1. — *Bactéries* (fig. 3)

Dans les lots 1, 2 et 3 le nombre de bactéries est initialement de $3{,}1.10^4$, $6{,}4.10^3$ et $3.10^5$ par gramme de graines respectivement, il régresse dans tous les cas au cours du stockage, les teneurs en eau étant trop faibles pour permettre une multiplication des bactéries.

2. — *Moisissures*

Initialement les graines hébergent une grande variété de moisissures. Elles appartiennent pour la plupart à la mycoflore dite du champ (CHRISTENSEN et KAUFMANN, 1968) : *Acremoniella atra, Alternaria tenuis, Alternaria alternata* et *tenuissima, Botrytis cinerea, Chaetomium funicolum, Cladosporium cladosporioides, herbarum* et *sphaerospermum, Fusarium moniliforme, mycelium dematié* stérile, *Neurospora crassa, Papulaspora, Pleospora herbarum, Rhizopus nigricans, Stemphylium botryosum, Trichothecium roseum, Torula herbarum, Ulocladium chartarum, Verticillium albo-atrum.*

La mycoflore dite « de stockage » (CHRISTENSEN et KAUFMANN, 1968), est représentée par *Aspergillus* des groupes : *candidus, flavus* (*A. tamarii*), *glaucus* (*A. repens, A. ruber*), *ochraceus, niger, restrictus* (*A. caesiellus*) et *versicolor* (*A. sydowii*), par *Mucor, Paecilomyces varioti* et par *Penicillium* (*cyclopium, brevicompactum, digitatum, expansum, erectum, italicum, jenseni, notatum, viridicatum*).

a) *Évolution de la mycoflore totale : interne et externe*

α) D'après les résultats de la méthode d'analyse par broyage.

Initialement, le nombre de propagules de moisissures est de l'ordre de quelques milliers (lot 3) à quelques dizaines de mille (lots 1 et 2) par gramme de graines.

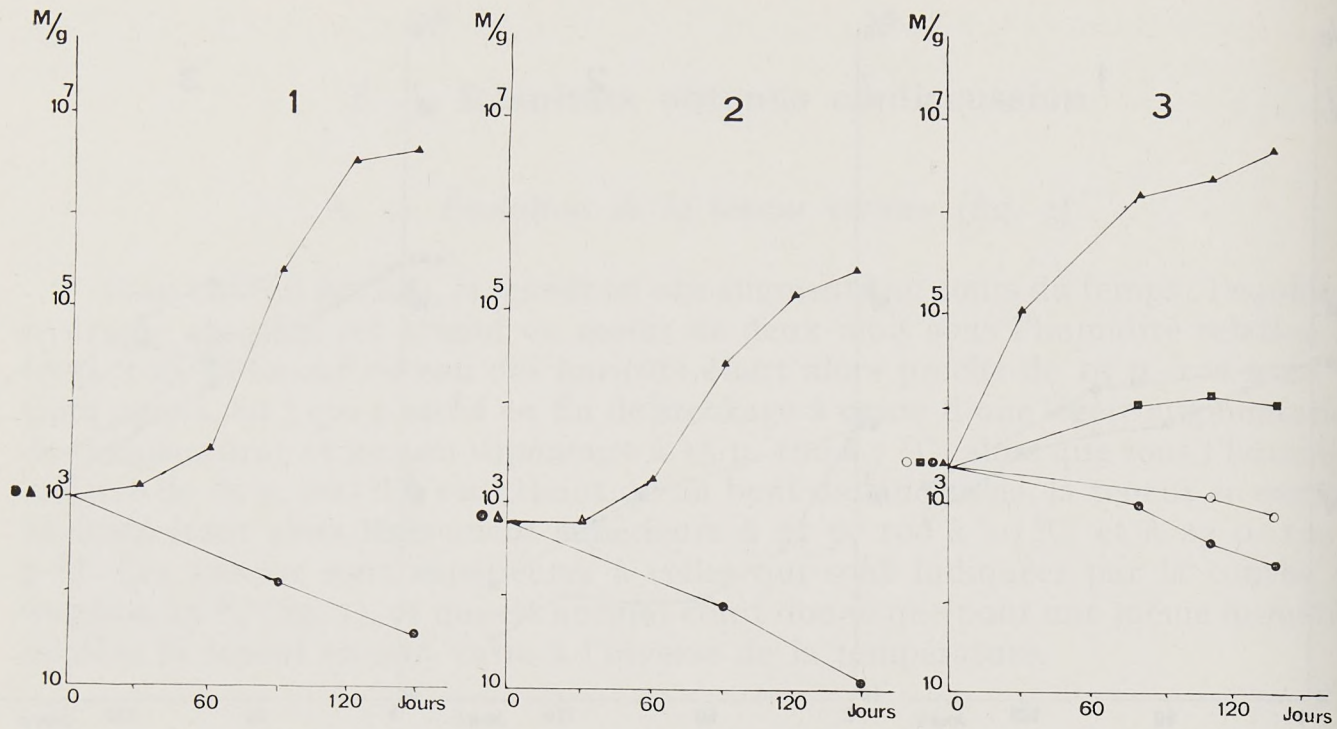



FIG. 4. — *Évolution quantitative de la mycoflore des lots 1, 2 et 3 de haricots au cours des essais de stockage :*
— à 20 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100* (— ▲—) *et de 65 p. 100* (●),
— à 7 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100* (— ■—) *et de 65 p. 100* (○).
Abscisse : durée de stockage en jours.
Ordonnée : nombre de moisissures par gramme de haricot (recensées sur milieu malt).

Au cours du stockage, que le dénombrement soit effectué sur milieu malt (fig. 4) ou sur milieu pour osmophile(*), le nombre de moisissures augmente sous l'humidité relative de 85 p. 100, les courbes de croissance des moisissures présentent une phase de latence (lots 1 et 2), une phase de multiplication active et une phase de multiplication ralentie. Des *Aspergillus* du groupe *glaucus* prédominent rapidement (surtout *A. repens*) à 20 °C tandis que des *Penicillium* (surtout *P. brevicompactum*) prédominent à 7 °C.

Sous l'humidité relative de 65 p. 100, toutes les espèces régressent de façon plus sensible à 20 °C qu'à 7 °C, comme le montrent les résultats obtenus à partir du lot 3.

L'ensemble de ces résultats concorde avec ceux trouvés au cours de travaux antérieurs effectués aussi bien sur céréales que sur graines oléagineuses et protéagineuses (CHRISTENSEN et KAUFMANN, 1968; CARANTINO *et al.*, 1976; CHARPENTIE *et al.*, 1976).

β) D'après les résultats des méthodes d'Ulster (fig. 5) et d'Ulster modifiée (fig. 6).

Au début des essais la proportion de graines contaminées par des espèces du champ est de l'ordre de 50 p. 100 dans le cas des lots 1 et 3 et de 26 p. 100 dans le cas du lot 2. Les espèces de stockage contaminent trois fois moins de graines que les espèces du champ dans les lots 1 et 3, la différence est moins forte pour le lot 2 cultivé en pépinière. Par la suite, dans le cas des stockages effectués sous l'humi-

(*) La comparaison entre les résultats obtenus avec le milieu malt et le milieu pour osmophile, a été effectuée à partir du test d'U-MANN et WHITNEY (*in* SNEDECOR, 1957). Aucune différence significative au seuil de 5 p. 100 n'ayant été observée, les résultats sur le milieu malt seront choisis comme valeurs de référence pour l'ensemble des calculs où intervient la valeur du peuplement des graines par les moisissures. Le choix de cette méthode de calcul non paramétrique a été motivé par le petit nombre de données disponibles et le manque d'information sur la loi qu'elles suivent.

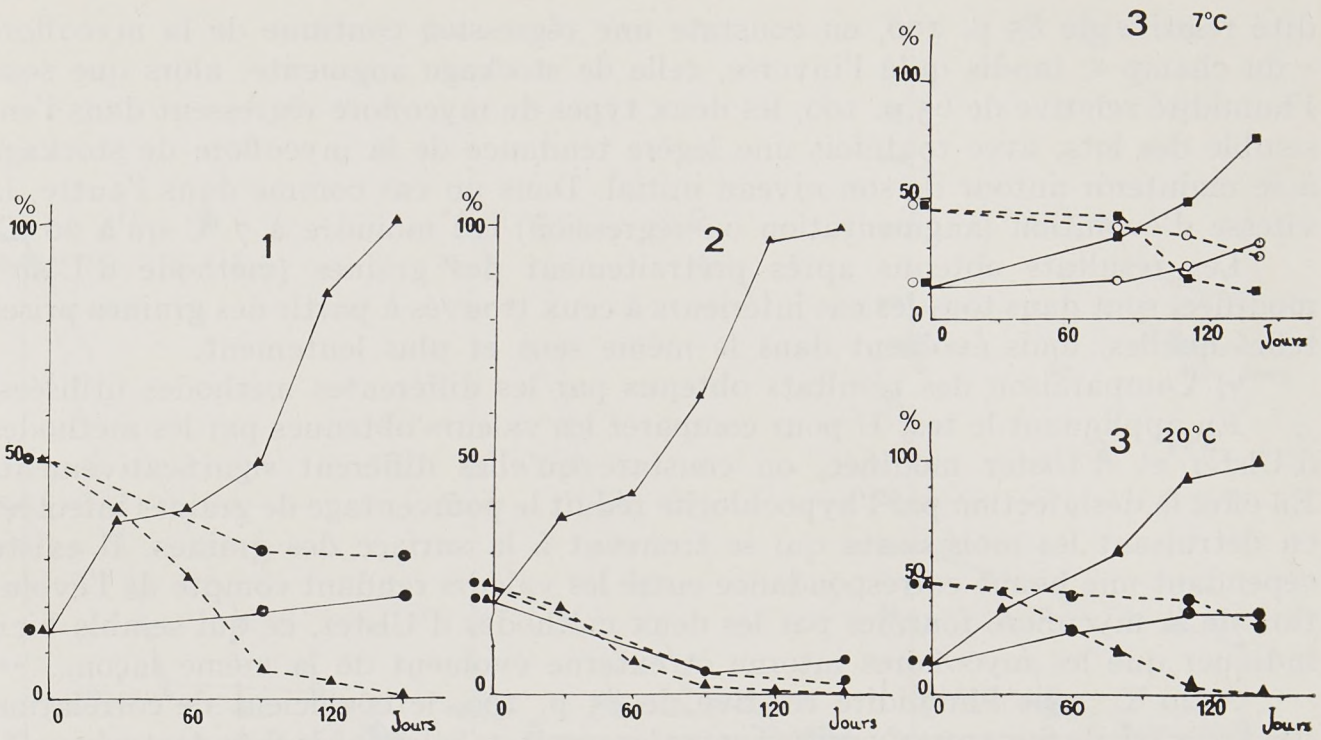



FIG. 5. — *Évolution quantitative de la mycoflore dite « du champ » (- - - -) et de la mycoflore dite « de stockage » (———) dans les lots 1, 2 et 3 de haricots au cours des essais de stockage sur des grains pris tels quels :*
— à 20 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100 (▲) et de 65 p. 100 (●),*
— à 7 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100 (■) et de 65 p. 100 (○).*
Abscisse : durée de stockage en jours.
Ordonnée : pourcentage de grains infectés.

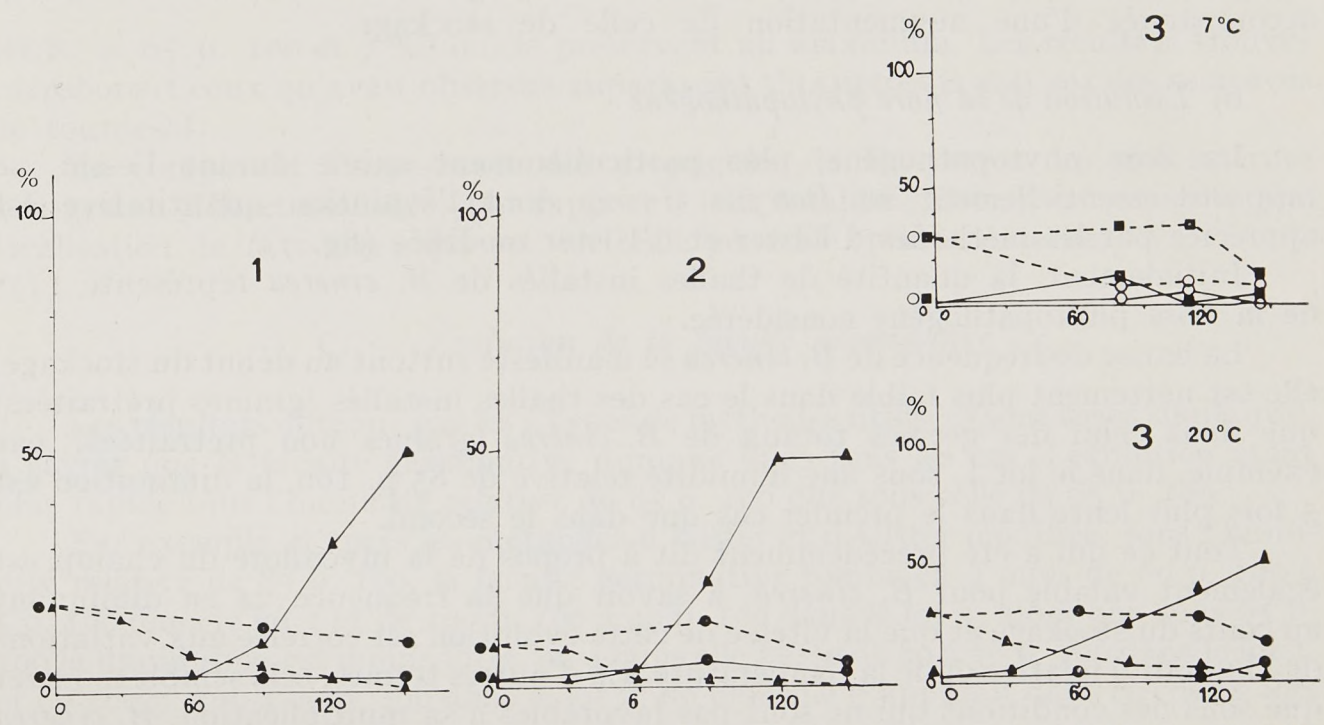



FIG. 6. — *Évolution quantitative de la mycoflore dite « du champ » (- - - - -) et de la mycoflore dite « de stockage » (———) dans les lots 1, 2 et 3 de haricots au cours des essais de stockage, (grains ayant subi une désinfection superficielle à l'hypochlorite) :*
— à 20 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100 (▲) et de 65 p. 100 (●),*
— à 7 °C, *sous des humidités relatives de 85 p. 100 (■) et de 65 p. 100 (○).*
Abscisse : durée de stockage en jours.
Ordonnée : pourcentage de grains infectés.

dité relative de 85 p. 100, on constate une régression continue de la mycoflore « du champ », tandis qu'à l'inverse, celle de stockage augmente; alors que sous l'humidité relative de 65 p. 100, les deux types de mycoflore régressent dans l'ensemble des lots, avec toutefois une légère tendance de la mycoflore de stockage à se maintenir autour de son niveau initial. Dans un cas comme dans l'autre, la vitesse d'évolution (augmentation ou régression) est moindre à 7 °C qu'à 20 °C.

Les résultats obtenus après prétraitement des graines (méthode d'Ulster modifiée) sont dans tous les cas inférieurs à ceux trouvés à partir des graines prises telles quelles, mais évoluent dans le même sens et plus lentement.

γ) Comparaison des résultats obtenus par les différentes méthodes utilisées.

En appliquant le test U pour comparer les valeurs obtenues par les méthodes d'Ulster et d'Ulster modifiée, on constate qu'elles diffèrent significativement. En effet la désinfection par l'hypochlorite réduit le pourcentage de graines infectées en détruisant les moisissures qui se trouvent à la surface des graines. Il existe cependant une bonne correspondance entre les valeurs rendant compte de l'évolution de la mycoflore fournies par les deux méthodes d'Ulster, ce qui semble bien indiquer que les mycoflores interne et externe évoluent de la même façon.

A 20 °C, sous l'humidité relative de 85 p. 100, le coefficient de corrélation des rangs ($r_s$) de SPEARMANN estimé entre les résultats relatifs à la flore de stockage(*) obtenus par la méthode d'Ulster et ceux donnés par la méthode par broyage est égal à 1 et significatif, selon KENDALL (*in* SNEDECOR), au seuil de 5 p. 100, ceci étant vrai pour tous les lots. Pour les autres données, aucune comparaison statistique n'est réalisable du fait qu'il n'y a pas de valeur fournie au seuil de 5 p. 100 dans la table, l'échantillonnage étant trop restreint.

La complémentarité des renseignements fournis par les différentes méthodes a permis de mettre en évidence que la phase de latence de la courbe de croissance des moisissures (fig. 4) correspond en fait à une régression de la flore du champ accompagnée d'une augmentation de celle de stockage.

b) *Évolution de la flore phytopathogène*

La flore phytopathogène, plus particulièrement suivie durant l'essai, se rapporte essentiellement au *Botrytis cinerea* dont l'évolution quantitative est appréciée par les méthodes d'Ulster et d'Ulster modifiée (fig. 7).

Initialement, la quantité de thalles installés de *B. cinerea* représente 1/7$^{e}$ de la flore phytopathogène considérée.

La baisse de fréquence de *B. cinerea* se manifeste surtout au début du stockage, elle est nettement plus faible dans le cas des thalles installés (graines prétraitées) que dans celui des germes totaux de *B. cinerea* (graines non prétraitées); par exemple, dans le lot 1, sous une humidité relative de 85 p. 100, la diminution est 5 fois plus lente dans le premier cas que dans le second.

Tout ce qui a été précédemment dit à propos de la mycoflore du champ est également valable pour *B. cinerea*, à savoir que sa fréquence va en diminuant au cours du stockage et que la vitesse de cette évolution est corrélée aux variations de l'humidité relative et de la température. En d'autres termes, cela semble montrer que sous des conditions qui ne sont pas favorables à sa multiplication, *B. cinerea* a une survie d'autant plus courte que les conditions où il se trouve sont plus proches du seuil favorable à son développement.

Fâcheusement, ce sont les meilleures conditions de conservation des semences

(*) Qui, d'ailleurs, est pratiquement la seule à être dénombrable après 1 mois de stockage, par la méthode de broyage.

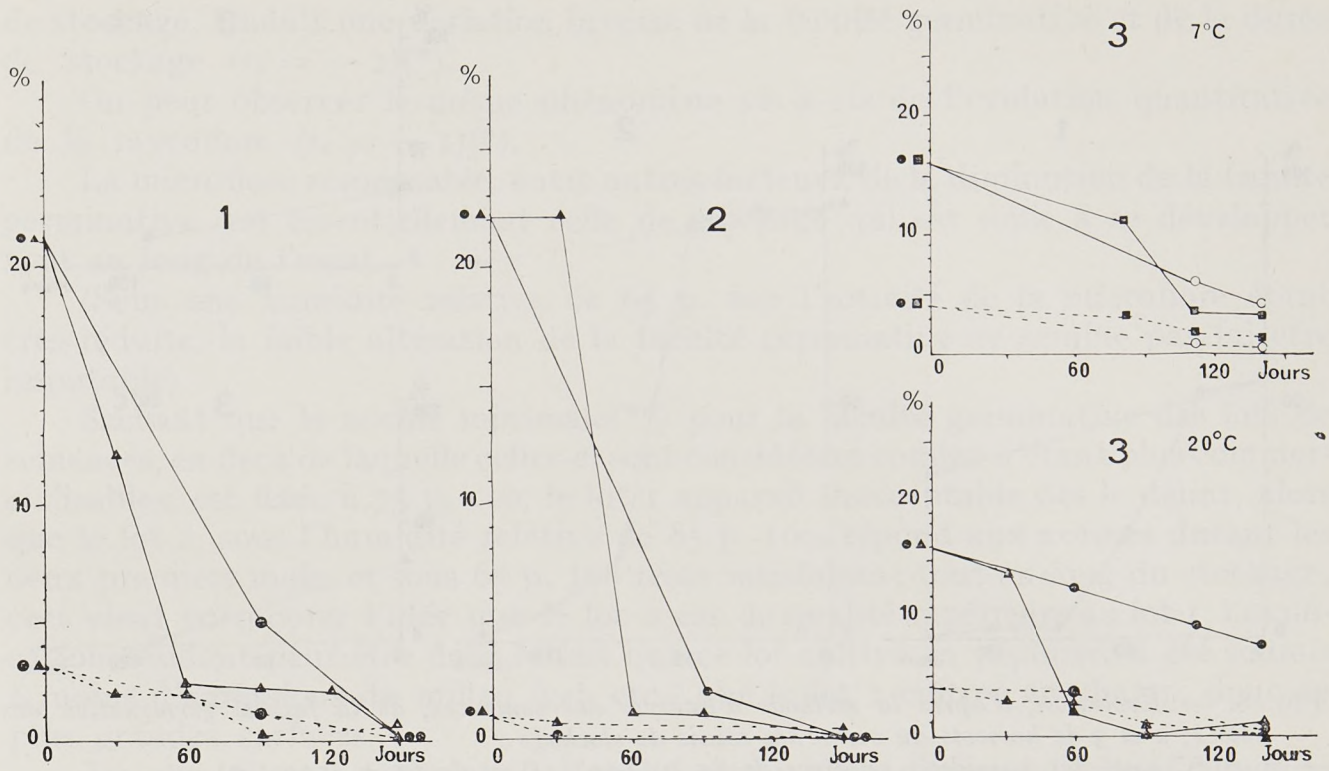



FIG. 7. — *Évolution quantitative de* Botrytis cinerea *dans les lots 1, 2 et 3 de haricots au cours des essais de stockage en fonction du temps :*
— à 20 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100* ( ▲) *et de 65 p. 100* ( ●),
— à 7 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100* ( ■) *et de 65 p. 100* ( ○).
Grains tels quels (———) et des grains désinfectés superficiellement à l'hypochlorite (- - - -)
Abscisse : durée de stockage en jours.
Ordonnée : pourcentage de grains infectés par *Botrytis cinerea*.

(H.R. = 65 p. 100 et 7 °C) qui le préservent au maximum. Les résultats trouvés corroborent ceux qu'avait observés auparavant CHAMPION (1964) sur des semences de tournesol.

En comparant l'importance des propagules de *B. cinerea*, les plus internes à la graine (Ulster modifiée) par rapport à leur totalité (Ulster), on constate une localisation de *B. cinerea* qui est, en règle générale, plutôt externe.

### C. — *Évolution de la faculté germinative*

Les résultats obtenus par les 2 types de méthodes utilisées sont assez similaires : à savoir que la faculté germinative diminue dans tous les cas, l'évolution étant plus rapide sous l'humidité relative de 85 p. 100 que sous celle de 65 p. 100.

Par exemple, d'après les méthodes d'Ulster et d'Ulster modifiée, sous l'humidité relative de 85 p. 100, la faculté germinative tombe en 4 mois de 80 p. 100 à 5 p. 100 dans le lot 1 et de 100 p. 100 à 40 p. 100 dans le lot 2; alors que sous 65 p. 100 la diminution est moins forte, en 4 mois elle passe de 80 à 70 p. 100 dans le lot 1, et de 100 p. 100 à 90 p. 100 dans le lot 2; de plus elle n'apparaît dans ces deux lots qu'après un certain délai, correspondant environ à 90 jours.

Dans le cas du lot 3, sous l'humidité relative de 85 p. 100, pendant les 3 premiers mois de stockage, la baisse de la faculté germinative est 2 fois plus rapide à 20 °C qu'à 7 °C.

Une légère différence entre les résultats obtenus sur graines désinfectées et non désinfectées peut être observée, surtout en ce qui concerne les lots 1 et 2

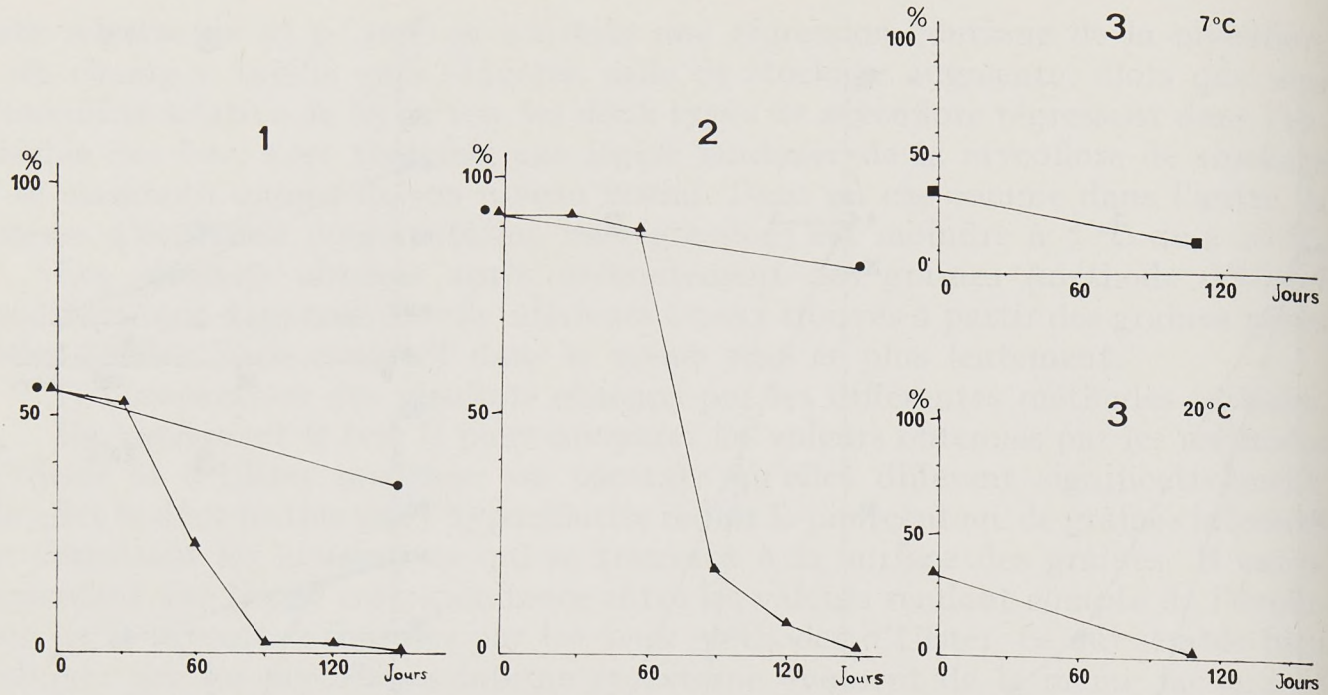



FIG. 8. — *Évolution, d'après la méthode d'analyse des semences, de la faculté germinative des lots 1, 2 et 3 de haricots au cours des essais de stockage :*
— à 20 °C *sous des humidités relatives de 85 p. 100 (▲) et de 65 p. 100 (●),*
— à 7 °C *sous une humidité relative de 85 p. 100 (■).*
Abscisse : durée de stockage en jours.
Ordonnée : pourcentage de graines germées.

pour lesquels la désinfection donne une valeur de la faculté germinative légèrement supérieure à celle obtenue sur graines non désinfectées. Ceci rejoint les conclusions d'ELLIS *et al.* (1976) sur l'action néfaste des moisissures vis-à-vis de la faculté germinative.

Les valeurs des résultats obtenus par la méthode d'analyse des semences (fig. 8)sont plus faibles que celles qui sont données par les méthodes précitées; ainsi elles sont initialement de 55 p. 100 et de 92 p. 100 pour les lots 1 et 2 et tombent à 1 p. 100 et 17 p. 100 respectivement en 4 mois sous l'humidité relative de 85 p. 100 à 20 °C.

La comparaison par le test de USMANN et WHITNEY des résultats fournis par les deux types de méthodes, indique en effet une différence significative au seuil de 5 p. 100; cette différence est due à l'appréciation faite par l'observateur au cours de l'expérience; l'observation dans le cas des méthodes d'Ulster ayant été moins affinée que dans celui des méthodes d'analyses des semences d'après les règles internationales (I.S.T.A.).

Il existe cependant une bonne corrélation des rangs(*) entre les valeurs rendant compte de l'évolution de la faculté germinative, obtenues à partir des deux types de méthodes utilisées (à titre d'exemple, à 20 °C sous une humidité relative de 85 p. 100 pour les lots 1 et 2, les coefficients de corrélation des rangs $r_s$ estimés sont égaux tous deux à + 1 et significatifs au seuil de 5 p. 100)(**).

Le calcul des coefficients de corrélation des rangs(*), entre les valeurs de la faculté germinative (d'après la méthode internationale d'analyse des semences) des graines stockées à 20 °C sous une humidité relative de 85 p. 100 et la durée

(*) D'après la méthode définie par SPEARMANN (*in* SNEDECOR, 1957).
(**) D'où l'intérêt des méthodes d'Ulster qui permettent, avec un minimum de manipulations, de suivre à la fois l'évolution de la microflore et de la faculté germinative sur un même échantillon.

de stockage, traduit une variation inverse de la faculté germinative et de la durée de stockage ($r_s = -1$)(*).

On peut observer le même phénomène vis-à-vis de l'évolution quantitative de la mycoflore ($r_s = -1$)(*).

La microflore responsable, entre autres facteurs, de la diminution de la faculté germinative, est essentiellement celle de stockage qui est seule à se développer tout au long de l'essai.

(Sous une humidité relative de 65 p. 100 l'activité de la microflore étant très réduite, la faible altération de la faculté germinative ne semble pas lui être imputable).

Sachant que la norme minimale(**) pour la faculté germinative des lots de semences, en deçà de laquelle celles-ci sont considérées comme n'étant plus commercialisables, est fixée à 75 p. 100, le lot 1 apparaît inacceptable dès le début, alors que le lot 2, sous l'humidité relative de 85 p. 100, répond aux normes durant les deux premiers mois, et sous 65 p. 100 reste satisfaisant tout au long du stockage; ceci vient corroborer l'idée que le lot 2 est de qualité supérieure au lot 1, l'explication résidant peut-être dans le fait que ce lot cultivé en pépinière a été soumis à moins d'agressions du milieu (gel, etc.) que le lot 1 cultivé au champ, donc en plus grandes surfaces.

De plus, il est à noter que la faculté germinative diminue d'autant plus vite que la qualité du lot est moins bonne au début du stockage, comme cela apparaît à l'examen des graphes de la figure 8.

### D. — *Évolution de la qualité technologique*

Le nombre de graines de haricots mises en expérimentation étant limité, l'appréciation de la qualité technologique n'a porté essentiellement que sur les lots 1 et 2, à 20 °C, sous des humidités de 85 p. 100 et 65 p. 100.

#### 1. — *Évolution des rendements* (tabl. 1)

Les valeurs fournies pour les rendements ne doivent être considérées que comme des informations sur la tenue des haricots au cours du temps, vis-à-vis des différentes phases d'appréciation qu'utilise l'industrie.

Les mesures des rendements n'ayant pas fait l'objet de répétitions en raison de la petitesse des échantillons, les résultats sont trop peu nombreux pour être exploités statistiquement; ils fournissent néanmoins une indication de tendance selon laquelle les rendements « blanchi » et « stérilisé » diminueraient au cours du stockage.

#### 2. — *Évolution des caractères organoleptiques*

La qualité du grain en tant que produit de consommation est en réalité surtout appréciée à partir des caractères organoleptiques, à savoir : le goût, l'aspect, la texture de la graine, etc...

Sous 85 p. 100, à 20 °C, il est fait état d'apparition de gemmules roses, de piqûres noirâtres sur les graines, avec pour le lot 1 un rancissement au bout du

(*) s : significatif au seuil de 5 p. 100 selon KENDALL (*in* SNEDECOR, 1957).

(**) Selon les « règlements techniques de la production, du contrôle et de la certification des semences de plantes de grandes cultures et légumières » adoptés par arrêté ministériel, tome I, 1975, Groupement National Interprofessionnel des Semences (G.N.I.S.).

TABLEAU I

*Évolution, en fonction du temps, des « rendements » des lots 1 et 2 stockés à 20 °C sous des humidités relatives de 85 p. 100 et de 65 p. 100*

| Durée de stockage en jour | | 0 | | 28 | | 56 | | 90 | | 122 | | 150 | | 300 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| « Rendements » | lots / HR | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Sec | 85 p. 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | |
| | 65 p. 100 | | | — | — | — | — | — | — | — | — | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Trempe | 85 p. 100 | — | — | 197 | 205 | 118 | 127 | 199 | 170 | 183 | 184 | 195 | 198 | | |
| | 65 p. 100 | | | — | — | — | — | — | — | — | — | 203 | 204 | 206 | 200 |
| Blanchi | 85 p. 100 | 222 | 216 | 200 | 209 | 166 | 154 | 209 | 193 | 188 | 200 | 194 | 193 | | |
| | 65 p. 100 | | | — | — | — | — | — | — | — | — | 211 | 206 | 209 | 211 |
| Stérilisé | 85 p. 100 | 276 | 260 | 244 | 252 | 203 | 204 | 248 | 246 | 228 | 246 | 228 | — | | |
| | 65 p. 100 | | | — | — | — | — | — | — | — | — | 245 | 239 | 245 | 253 |

quatrième mois, le lot 2 gardant un goût normal jusqu'à la fin du stockage (5 mois dans ce cas). Ceci confirme que le lot 1 était initialement de moindre qualité comparé au lot 2. Sous l'humidité relative de 65 p. 100, à 20 °C, ces caractères se sont peu dépréciés, au cours du temps (durée de l'essai : 10 mois).

### E. — *Évaluation de la durée de conservation des stocks*

Les essais de stockage ayant été effectués en petit nombre et étant limités dans le temps, les données recueillies restent très partielles, néanmoins à partir des courbes isothermes (20 °C et 7 °C) d'évolution du nombre de germes fongiques, il est possible d'obtenir des indications sur la durée de bonne conservation des graines de haricot en fonction des conditions hydriques des essais de stockage.

Le niveau du peuplement fongique des graines est seul retenu pour juger de leur état de conservation puisque les bactéries régressent dans tous les lots dès le début des essais (cf. fig. 3). Pour des raisons pratiques, la valeur seuil du nombre de germes de moisissures (essentiellement espèces de stockage) par gramme de graine, au-delà de laquelle le lot est considéré comme dégradé, est fixée à $10^5$, valeur maintes fois retenue pour des céréales, des graines oléagineuses ou protéagineuses, parce qu'à ce niveau du peuplement fongique les graines sont très légèrement mais visiblement moisies, ce qui déprécie leur aspect.

TABLEAU 2

*Durée de bonne conservation des haricots d'après les différents critères examinés*

| H.R. p. 100 | Température (°C) | Lot | Durée de bonne conservation en mois d'après le critère | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Microbiologique | Faculté germinative | Organoleptique |
| 85 | 20 . . . . . | 1 | 3 | 2 < < 3 | 4 |
| | | 2 | 4 | | 5 < |
| | | 3 | 1 | | |
| | 7 . . . . . | 3 | 4 < | | |
| 65 | 20 et 7 . . . | 1 | 10 < | 5 < | 10 < |
| | | 2 | 10 < (durée de l'essai) | | |
| | | 3 | 10 < | | |

Les durées de bonne conservation des haricots ainsi évaluées d'après les résultats de la méthode d'analyse par broyage(*), sont consignées dans le tableau 2.

Ces durées de conservation sont inférieures à celles de la féverole (CARANTINO *et al.*, 1976), graine protéagineuse métropolitaine, qui elle-mêmes sont du même ordre de grandeur que celles du pois sec (CHARPENTIÉ *et al.*, 1976). Cette meilleure tenue du pois, au stockage, comme de la féverole, par rapport au haricot, peut s'expliquer par une meilleure protection mécanique de la graine.

Le lot 2 d'une qualité initialement supérieure à celle du lot 1, ainsi qu'en témoigne la valeur de la faculté germinative, (93 p. 100 et 55 p. 100) résiste mieux à la colonisation fongique que le lot 1 qui lui même se conserve plus longtemps que le lot 3; ceci confirme et souligne l'importance de l'état initial de la graine sur la durée de vie des stocks (POISSON et CAHAGNIER, 1974).

La diminution de la faculté germinative est également d'autant plus rapide que la qualité initiale du lot est moins bonne, ainsi elle est réduite de 50 p. 100 en moins de deux mois pour le lot 1 et en deux mois et demi pour le lot 2. La faculté germinative du lot 2 conserve une valeur satisfaisante supérieure à 75 p. 100 pendant un peu plus de 2 mois à 20 °C sous l'humidité relative de 85 p. 100 et pendant plus de 5 mois sous l'humidité relative de 65 p. 100. Le seuil de 75 p. 100 pour la faculté germinative est donc plus sévère que le seuil de $10^5$ germes fongiques par gramme de grains puisqu'on juge ainsi que le lot 2 se conserve de façon satisfaisante pendant 4 mois par référence au premier critère et pendant presque 3 mois par référence au second critère.

(*) Le classement des lots d'après les méthodes d'Ulster est inversé, en effet, à l'issue de la période de bonne conservation à 20 °C sous l'humidité relative de 85 p. 100, la proportion de graines infectées est voisine de 50 p. 100, 97 p. 100 et 36 p. 100 dans les lots 1, 2 et 3, respectivement; ceci est dû, sans doute, au fait que ces dernières méthodes ne rendent compte que du nombre de graines contaminées, mais non de l'importance de cette contamination au niveau de chaque graine. Quoiqu'il en soit, c'est bien le classement d'après les résultats de la méthode par broyage qui correspond au classement d'après les valeurs de la faculté germinative. Ceci n'est pas en contradiction avec le fait qu'il y a une bonne corrélation des rangs entre les résultats de deux types de méthodes (par broyage et Ulster) car cette corrélation est relative au sens de l'évolution des valeurs, mais non à la vitesse d'évolution.

En ce qui concerne la qualité organoleptique, le goût des haricots du lot 2 présente des caractéristiques initialement meilleures que celles du lot 1; par la suite, un goût rance désagréable est détecté dans le lot 1 après 4 mois de stockage alors que le lot 2 est encore satisfaisant à la fin du stockage.

La durée de conservation des haricots destinés à l'alimentation, déterminée d'après les caractères organoleptiques, est donc plus longue que la durée de conservation déterminée d'après le niveau de pollution fongique, ceci est à rapprocher du fait que le développement des moisissures de stockage précède toujours, dans le cas de graines entières, l'augmentation de l'acidité grasse, (GUENOT et POISSON, 1974) mais sur le plan hygiénique le choix d'un critère goût ne constitue peut-être pas une garantie suffisante contre les risques dûs à un éventuel développement de moisissures toxinogènes.

## Conclusion

Il n'est pas exceptionnel que des stocks de haricots secs subissent des pertes substantielles au cours de l'entreposage et des opérations de manutention, pertes et dégradations qui, pour une bonne part, peuvent être d'origine fongique.

Pour pallier le manque d'informations concernant ce problème, il a paru utile d'apporter des précisions sur le comportement des haricots secs au cours du stockage en fonction des conditions réalisées. Dans le cadre d'une telle étude, le présent travail a porté sur des essais de stockage de flageolets (variété Ardent) effectués à 20 °C et 7 °C en atmosphère non ventilée, sous des humidités relatives de 85 p. 100 et 65 p. 100.

Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

La microflore des haricots examinés est banale et semblable à celle des autres graines métropolitaines.

Sous les conditions expérimentales précitées, les bactéries régressent au cours du temps, il en est de même des moisissures sous l'humidité relative de 65 p. 100 à 20 °C comme à 7 °C, température à laquelle la baisse est moins accentuée. Sous l'humidité relative de 85 p. 100 les moisissures se développent et se multiplient activement, leur taux de multiplication étant plus élevé à 20 °C qu'à 7 °C. La fréquence des moisissures du champ initialement dominante diminue quelles que soient les conditions expérimentales réalisées au cours de cet essai de conservation, ce sont donc essentiellement les moisissures dites de stockage (*Penicillium* et surtout *Aspergillus*), présentes en très faibles quantités à la récolte, qui se multiplient.

L'attention plus particulière portée à *Botrytis cinerea*, confirme la disparition au cours du stockage des moisissures du champ; il faut noter que cette régression est d'autant plus lente que le stockage est effectué dans de meilleures conditions, soit à basse température et sous une faible humidité relative.

Les données précédentes relatives à l'évolution des divers critères de qualité observés permettent d'avoir des indications sur la durée minimale de conservation des haricots secs :

— dans le cas des graines initialement saines stockées à 20 °C sous une humidité relative de 85 p. 100 (teneur en eau des haricots en équilibre hydrique avec l'atmosphère de stockage = 21 p. 100) la durée de conservation de la faculté germinative n'est que de 3 mois environ, tandis que les qualités organoleptiques sont encore satisfaisantes après 5 mois (durée de stockage après battage) malgré

un niveau de peuplement fongique déjà élevé qu'il serait sans doute bon de ne pas négliger sur le plan sanitaire. Les durées de conservation auraient évidemment été plus courtes si les haricots s'étaient trouvés d'emblée en équilibre hydrique avec l'atmosphère de stockage.

La dégradation de la valeur d'utilisation des graines de moindre qualité est plus rapide, ce qui souligne bien l'influence de l'état initial des graines sur leur aptitude au stockage.

Ce sont les essais de stockage réalisés à faible humidité relative (65 p. 100 — teneur en eau des haricots en équilibre hydrique avec l'atmosphère de stockage = 14,7 p. 100) qui ont donné les meilleurs résultats : pas de développement de micro-organismes, maintien de la faculté germinative au-dessus de 75 p. 100 et préservation des qualités organoleptiques pendant la durée des essais (10 mois dans ce cas).

L'étude effectuée ne constituant qu'un sondage préliminaire, il serait intéressant de préciser et de compléter les indications relatives à la durée de conservation du haricot par des essais de stockage plus nombreux effectués à plusieurs températures et à des humidités relatives situées dans la zone limite de démarrage des moisissures où une faible augmentation de la teneur en eau des grains peut entraîner le développement des microorganismes. De plus il serait nécessaire de préciser non seulement l'influence de l'état de la graine à la récolte mais aussi celui des conditions de préstockage en gousse, de battage et de séchage.

Sur le plan méthodologique, une bonne corrélation de rang a été mise en évidence entre les résultats des dénombrements microbiens effectués par la méthode des dilutions ensemencements et par les méthodes d'Ulster et d'Ulster modifiée. De même il y a une bonne corrélation de rang entre les valeurs de la faculté germinative obtenues à partir des règles internationales pour les essais de semences et à partir de la méthode d'Ulster. Ceci autoriserait à n'utiliser que la méthode d'Ulster pour suivre uniquement l'évolution de la qualité d'un stock, tandis que les règles des essais de semences pour la faculté germinative et la méthode microbiologique de dénombrement par dilutions-ensemencement permettent à la fois de suivre l'évolution d'un stock et d'évaluer son état de conservation.

La répétabilité des méthodes d'appréciation de la qualité technologique des haricots destinés à l'alimentation ne paraît pas, pour l'instant, suffisante et demanderait à être améliorée.

*Reçu pour publication en décembre 1978.*

## Remerciements

Nous tenons à remercier Monsieur COLENO qui a permis la réalisation de ce travail, Monsieur FOUILLOUX qui nous a procuré le matériel biologique mis en stockage, Messieurs COEZ et AYROULET de la Société WILLIAM-SAURIN dont le Laboratoire de recherches a effectué les tests de qualité technologique, et Messieurs ANSELME et DAUSSE pour leur participation aux mesures de la faculté germinative.

## Summary

*Storage of dry beans* (Phaseolus vulgaris) : *Evolution of their microflora, of their germinative power and their technological quality in relation with storage characteristics.*

Industrial storage of dry beans, in connection with modified retail trading, requires a better knowledge of the storage behavior of beans.

Evolution of the microflora of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) was investigated in relation

with evolution of germinative power and technological quality storage trials were conducted on « flageolet » beans —« Ardent » type— with three classes of beans (good quality, second and low) and 13.5 p. 100 moisture content after threshing, under two rates of relative humidity (R.H. 85 p. 100 and 65 p. 100) in unrenewed atmosphere.

Evolution curves of moulds, germinative power and technological tests (behavior after industrial hydratation, organoleptic quality) provided an estimate for length of storage: for example, under R.H. 85 p. 100 at 20 °C, quality was good up to 2 or 3 months for germinative power, up to 4 months considery microbiological development, up to 5 months from the organoleptic point of view, more than 5 months under R.H. 65 p. 100. Lenght of storage was improved with lower temperature and higher quality of the beans.

The method of culture after dilutions proved better than the Ulster methods: microbiological data so obtained were more consistent with germinative power data on organoleptic data.

During storage, *Botrytis cinerea* decreased in all the plots, but more slowly under improved storage conditions, i.e. at lower temperature under lower relative humidity.

Key words: Phaseolus vulgaris, *storage, microflora, germinative power, technological quality.*

## Références bibliographiques


Adair C. N., 1971. Influence of controlled atmosphere storage conditions on cabbage post harvest decay. *Plant Dis. Rep.*, **5**, 864-868.

Brooks C. et Cooley J. S., 1917. Temperature relations of apple rot fungi. *J. Agric. res.*, **8**, 139-164.

Burr K. H., Kon S., Morris H. J., 1968. Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature and time of storage. Food technol., **22**, 336-338.

Cahagnier B., Melcion J. P., Nguyen Thi Cuc, Poisson J. et Rougeot J., 1977. Stockage d'aliments composés pour rats et visons après addition d'agents conservateurs. Evolution microbiologique. *Ann. Technol. Agric.*, **26** (I), 59-77.

Carantino S., Poisson J., Cahagnier B., 1976. — La microflore des graines de féverole : son évolution au cours d'essais de stockage en fonction des conditions hydriques réalisées. *Revue de Mycologie*, **40**, 223-243.

Champion R., 1964. Techniques d'étude de la microflore fongique des semences de tournesol; application aux problèmes de conservation et de désinfection des semences. *Mémoire pour le titre d'ingénieur D.P.E.*, 1964, C.N.A.M.

Charpentie M. J., Poisson J., Cahagnier B., 1976. — Évolution de la microflore du pois en fonction des conditions de stockage. *Revue de Mycologie*, **40**, 401-415.

Christensen C. M., Kaufmann H. H., 1965. Deterioration of stored grains by fungi. *Annu. Rev. Phytopathology*, **3**, 69-84.

Christensen C. M. et Kaufmann H. H., 1968. Grain storage. The role of Fungi inquality loss. University of Minesota Press Mineapolis.

Ellis M. A., Galvez G. E., Sinclair J. B., 1976. Efecto de très fungicidas sobre la germinacion de semilla infectada de frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Turrialba*, **26**, 399-402.

Guenot M. C., Poisson J., 1974. Évolution de la microflore et de la composition lipidique des amandes de tournesol pendant le stockage. Proceedings of the 6th international sunflower conference, Bucharest, 715-725.

Guilbot A., Multon J. L., Martin G., 1973. — Détermination de la teneur en eau des semences. *Seed Sci. and Technol.*, **1**. 587-612.

Habish H. A., 1972. Aflatoxin in haricot bean and other pulses. *Expl. Agric.*, **8**, 135-137.

Jordao B. A., Carvalho G. R., Sartori M. R., Angelucci E., de Freitas Leitao M. R., Irineu da Costa S., Miya E. E., 1976. Bulk storage of dry beans in industrial scale in silos with artificial aeration. *Coletanea Inst. Tech. Aliment.*, **7**, 2, 265-289.

Mislivec P. B., Bruce V. R., 1977. Mold Flora in dried beans and soybeans. *J. Ass. off. Anal. Chem.*, **60**, 3.

Multon J. L., Poisson J., Guilbot A., 1969. Les altérations du grain de blé après la récolte. *B.T.I.*, **244**, 1-18.

MULTON J. L., 1978. Notes communiquées aux auteurs.

MUSKETT A. E., MALONE J. P., 1940. The Ulster method for the examination of flax seed for the presence of seed-borne parasites. *Ann. Appli. Biol.*, **28**, 1, 8-13.

POISSON J., CAHAGNIER B., 1974. Développement des moisissures sur les graines en fonction de diverses caractéristiques du substrat et de la population fongique. Conférence O.E.P.P. sur les déprédateurs des produits stockés Paris (1, rue Le Nôtre).

ROCKLAND L. B., 1960. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40°. Fruit and vegetable chemistry laboratory, 263 South Chester av., Pasadena Calif. *Analytical chemistry*, vol. 32, n° 10.

SCHNEIDER-ORELLI O., 1912. Versuche über die Wachstumsbedingungen und Verbreitung der Faülnispilze des Lagerobstes. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd*, **32**, 161-169.

SNEDECOR G. W., COCHRAN W. G., 1957. Méthodes statistiques. Association de coordination technique agricole, Paris.

WINSTON P. W., BATES D. H., 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*, vol. 4, n° 1, Dpt. of Biology. University of Colorado.

ZINK E., D'ARTAGNAN DE ALMEIDA L., DO LAGO A A., 1976. Observaçôes sobre o comportamento de sementes de feijão sob differentes condiçôes de armazenamento. Bragantia, **35**, n° 38, 443-451.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (1), 79-105.

# L'aptitude à la panification des blés tendres appréciée par le comportement des pâtes au pétrissage

A. BOURDET et Renée BERRIER

*Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I.N.R.A.*
*16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris*

## Résumé

Plus de 400 échantillons de blé tendre représentatifs de la production française ont été étudiés entre 1972 et 1976 à l'aide de deux méthodes miniaturisées; l'une enregistrant les variations du couple au pétrissage à l'aide d'un pétrin de type Mixographe, l'autre appréciant l'aptitude à la panification par cuisson.

On présente les mixogrammes types obtenus sur une même farine avec deux systèmes enregistreurs et on définit les paramètres au couple maximum retenus : temps de pétrissage (T mn) hauteur (H cm) et surface (S $cm^2$) des mixogrammes.

On montre l'influence respective du taux d'hydratation, de la nature des solutions (rôle de ClNa) en soulignant l'importance de la consistance et de la composition des pâtes lors de pétrissages comparatifs.

Alors qu'à consistance et composition constantes, H est peu modifié, T et S accusent d'importantes variations selon le niveau de force des blés. T est caractéristique du type de blé et indépendant de l'enregistreur alors que S, également caractéristique, varie selon l'enregistreur. Les valeurs de S obtenues d'un enregistreur à l'autre sont hautement corrélées.

On présente les résultats obtenus au pétrissage et à la cuisson sur diverses séries de blés faibles, courants et forts ainsi que quelques mixogrammes caractéristiques. On montre que les valeurs S et T sont significativement corrélées aux volumes des pains miniaturisés. Il en est de même pour les essais de panification type français et, à un degré moindre, européen.

L'essai au Mixographe, éventuellement complété du test de cuisson miniaturisé, semble offrir une possibilité intéressante pour différencier les blés panifiables des blés fourragers.

On souligne enfin l'intérêt d'une miniaturisation des méthodes appréciant la valeur « panifiable » des blés, tant pour la sélection que pour l'industrie.

Mots clés : *blés tendres, valeur panifiable, comportement au pétrissage, enregistrement, pâtes hydratation, composition, consistance, cuisson miniaturisée, panification industrielle, corrélations.*

## Introduction

La crainte de voir se développer, au sein des marchés nationaux et communautaire, certaines variétés de blé très productives mais impropres à la panification, a conduit les instances de la C.E.E. à répartir les blés commercialisés en 2 catégories selon qu'ils conviennent ou non aux besoins de la boulangerie.

Les critères indirects, tels que ceux préconisés en France par l'O.N.I.C. pour le classement des blés (indice Zeleny, teneur en protéines) de 1969 à 1976, se sont révélés insuffisamment discriminants pour différencier les blés panifiables des blés « fourragers ». La méthode d'électrophorèse des gliadines, appliquée grain par grain à un micro-échantillon représentatif (Autran, Bourdet, 1975), constitue le moyen le plus fiable pour reconnaître les variétés indésirables présentes dans un lot; mais elle reste de réalisation délicate et ne fournit que des informations approchées sur la valeur technologique du lot.

C'est pourquoi, après avoir tenté de se référer aux caractéristiques des pains fournis par un essai de panification « européen » encore à l'étude (C.E.E. 1975 à 1977), la différenciation est désormais officiellement fondée sur un essai dit de « machinabilité » qui apprécie le caractère collant ou non collant des pâtes au pétrissage et au façonnage (C.E.E., 1976). Même si sa spécificité à cet égard demeure discutable, un tel essai ne peut apporter d'informations sur les différents niveaux de qualité des blés panifiables comme peut le faire un essai de panification traditionnel.

De toute façon, l'essai de machinabilité conçu pour les besoins du commerce (stockage, exportation) et des secteurs de l'utilisation (meuniers boulangers) reste inapplicable en sélection précoce du fait des quantités élevées de matériel (1,5 kg blé) qu'il réclame.

Il entre néanmoins désormais dans les normes technologiques d'inscription des variétés nouvelles au catalogue français, assorti de l'essai de panification normalisé par le C.N.E.R.N.A. (1969) et complété des critères indirects de la teneur en Protéines et de l'Alvéographe.

Quant à la sélection précoce, qui ne peut s'exercer que sur des quantités de grain limitées, elle continue à se référer aux critères indirects de Zeleny et de Pelshenke, éventuellement complétés des informations fournies par l'essai de cuisson miniaturisé (Bourdet, Berrier, 1972, 1973).

Le comportement des pâtes au cours du pétrissage a été depuis longtemps mis à profit pour apprécier l'aptitude à la panification des blés et des farines et les pétrins enregistreurs du type Farinographe et Mixographe demeurent les plus utilisés dans de nombreux pays.

Ces deux appareils, qui ont fait l'objet de plusieurs études comparatives (Sibbitt, Harris, Concon, 1953; Shuey, 1963; Hoseney, Finney, 1974), font intervenir la mesure d'un couple. Ils enregistrent les modifications de mobilité de la pâte en fonction du temps et fournissent ainsi un moyen de mesurer des propriétés telles que le temps de développement, la stabilité au pétrissage et la vitesse d'affaiblissement des pâtes.

Le Farinographe est surtout utilisé dans les pays anglo-saxons grands producteurs de blé et a la préférence des meuniers et des boulangers. Il a été néanmoins utilisé en France à des fins de sélection sur des moutures entières de grains soit avec le pétrin de 50 g (Leclercq, 1961), soit en version miniaturisée avec un pétrin de 10 g (Bourdet, Berrier, Autran, 1976).

Conçu en 1933 par Swanson et Working, le Mixographe est peu connu en France. De faible capacité (30 à 40 g), il permet de travailler sur des prises d'essais réduites, ce qui explique qu'il ait été principalement mis à profit dans des programmes de sélection qualitative précoce. Certains travaux effectués dans ce but se sont adressés directement à des moutures entières de grains de caractéristiques granulométriques bien définies (Johnson, Swanson, 1942; Lamb, 1944; Sibbitt, Harris, 1945; Rubenthaler, Bruinsma, Anderson, 1977). D'autres ont utilisé des farines préparées par mouture expérimentale (Swanson, 1936-1939; Larmour,

WORKING, OFELT, 1939; MORRIS, BODE, HEIZER, 1944; YAMAZAKI, 1947; BARMORE, 1958; SHELLENBERGER, SHOGREN, LAUDE, 1958; SOLLARS, BARRETT, 1964; FINNEY, YAMAZAKI, 1967).

L'étude que nous avons nous-mêmes effectuée récemment (BOURDET, BERRIER, AUTRAN, 1976) sur farines expérimentales, intéressait un ensemble de 195 échantillons parmi lesquels un nombre important de lignées.

Largement mis à profit dans les travaux de sélection, le Mixographe s'est révélé également utile pour une estimation rapide de la qualité des blés récoltés avant stockage (JOHNSON, SWANSON, 1942; SIBBITT, HARRIS, 1945) ainsi que pour le contrôle de la régularité des farines en meunerie et boulangerie (LARMOUR, WORKING, OFELT, 1939; SWANSON, 1941).

L'intérêt du Mixographe en vue d'établir les différences de qualité entre blés et pour caractériser divers types de farines, a été récemment confirmé par les études de FINNEY *et coll.* (1977-1978) sur 22 variétés européennes incluant certains blés non panifiables.

Dans la version initiale de l'appareil, l'enregistrement du couple était assuré par un système mécanique à ressort. En 1966, l'équipe canadienne de VOISEY (VOISEY, MILLER, KLOEK) a mis au point un système électronique d'enregistrement, éliminant presque totalement les influences de friction de l'enregistrement mécanique. Selon les auteurs, ce système, qui élimine le déplacement de la pâte dans le bol du pétrin, améliore la précision et la sensibilité ainsi que la qualité de l'enregistrement. Il a été d'abord adapté à l'appareil classique (capacité 30 à 40 g de farine), puis à 2 versions miniaturisées (5 et 10 g de farine).

En 1972, FINNEY et SHOGREN ont, de leur côté, mis au point un micro-mixographe utilisant de même 10 g de farine, mais muni d'un système classique à ressort.

Dans le cadre de nos travaux sur les méthodes d'appréciation de la qualité des blés, l'étude entreprise avait pour objet :

— d'examiner les possibilités offertes par un pétrin enregistreur de type Mixographe pour juger objectivement de l'aptitude des blés à la panification, tant sur le plan de leur sélection que de leur classement après récolte en fonction de leur utilisation ultérieure, qu'il s'agisse de blés capables de satisfaire la boulangerie ou les industries annexes, que de ceux devant être orientés vers l'alimentation animale;
— de comparer à cet égard les performances respectives de deux types d'enregistreurs;
— de préciser enfin la signification technologique des informations fournies par le Mixographe par référence aux résultats de trois types d'essais de cuisson, dont l'un, miniaturisé, peut être effectué en laboratoire (BOURDET, BERRIER, 1973), la réalisation des deux autres, qui ressortent du contrôle industriel, impliquant l'intervention d'un boulanger professionnel au niveau du fournil expérimental (C.N.E.R.N.A., 1969; C.E.E., 1975 à 1977).

## Matériels et méthodes

### *Matériels d'étude*

L'étude a concerné plusieurs centaines d'échantillons technologiquement très diversifiés, d'origines culturales et d'années de récolte différentes (1972 à 1976).

Le matériel d'étude était, selon les cas, constitué de diverses lignées en cours

de sélection (blés d'hiver et de printemps), de variétés françaises et étrangères multipliées en champs d'essais, de lots variétaux du commerce prélevés au stockage, enfin de divers types de farines industrielles.

## *Méthodes utilisées*

— *Préparation des farines*

Les grains sont éventuellement conditionnés à environ 15,5 p. 100 d'humidité et la mouture effectuée sur moulin de laboratoire Brabender Junior à tamis rotatif (taux d'extraction 55 à 65 p. 100 selon les types de blé). La farine expérimentale obtenue est homogénéisée sur tamis à large ouverture (400-450 μ) et, si nécessaire, stockée en chambre froide vers 5 °C avant utilisation.

— *Capacité d'hydratation des farines*

Pour une consistance de pâte donnée, elle est déterminée au Microfarinographe Brabender sur une prise d'essai de 10 g de farine par addition, selon les cas, d'eau distillée, d'une solution à 4 p. 100 de ClNa, ou de la solution sel-sucre-bromate utilisée pour l'essai de cuisson.

— *Micropétrin*

Le micropétrin utilisé (type Minorpin-Simon) présente des caractéristiques analogues à celles du pétrin conçu pour le Mixographe : bol recevant la prise d'essai (capacité 30 à 40 g de farine) muni de 3 broches fixes, tête à 4 broches mobiles animées d'un mouvement planétaire (rotation 80 t /min). La partie inférieure du socle sur lequel repose le bol est munie d'un couplemètre (capteur) transformant les sollicitations mécaniques de la pâte en impulsions électriques. Celles-ci sont amplifiées puis transmises à un enregistreur potentiométrique.

— *Systèmes enregistreurs*

Nous avons disposé de 2 types d'enregistreurs respectivement désignés par E1 et E2.

E1 (Mle P 62 Electrosynthèse), à vitesse de déroulement 1,5 cm /min. Pour un couple de 5 000 g /cm, le déplacement de la pointe enregistreuse est de 7,3 cm.

E2 (Mle V /E 11 FC Servotrace) à vitesse de déroulement de 2,5 cm /min. L'amplitude d'inscription est de 10 cm pour une même valeur du couple 5 000 g /cm.

— *Détermination des caractéristiques de pétrissage*

Pour une prise d'essai de 40 g par exemple, on ajoute à la farine déposée dans le bol 20 ml d'une solution contenant par litre : 30 g ClNa, 30 g saccharose, 100 mg de $BrO_3K$. Selon que l'essai concerne la seule phase du pétrissage (Mixographe) ou est poursuivi jusqu'à la cuisson, on ajoute 2 ml d'eau ou 2 ml d'une suspension de levure fraîche pressée à 40 g /100 ml et on complète par un volume d'eau tel que le volume total des solutions ajoutées corresponde à la capacité d'hydratation de la farine déterminée préalablement.

La pâte ainsi confectionnée contient, pour 100 g de farine, 1,5 g de sel, 1,5 g de sucre, 5 mg de bromate, la quantité d'eau correspondant à la consistance désirée et, le cas échéant, 2 g de levure.

Le pétrin, relié au système d'enregistrement, est mis en marche et le pétrissage poursuivi pendant 9 min. On détermine alors les caractéristiques T, H et S du mixogramme enregistré.

— *Essai de cuisson*

Dans le cas où la pâte pétrie doit être soumise à l'essai de cuisson, elle est récupérée quantitativement et déposée sur un verre de montre. On l'introduit dans une enceinte réglée à 30 ± 1 °C et 80 p. 100 H.R. et on la soumet à une première fermentation de 30 min.

Le pâton est alors boulé mécaniquement pendant 30 s (bouleuse Brabender type C.E.E. de capacité réduite à 360 ml), puis soumis à un léger façonnage manuel jusqu'à atteindre une longueur d'environ 7 cm.

Il est alors déposé dans un moule métallique légèrement huilé, de forme tronc pyramidale (base 4,5 × 8,5 cm, sommet 6,5 × 11 cm, hauteur 5 cm) de capacité 300 ml environ, puis soumis à une seconde fermentation de 150 min à 30 °C, après quoi il est introduit dans le four.

La cuisson est effectuée au four électrique (Chopin, Mle MGC) en présence de vapeur d'eau à 250 ± 5 °C pendant 20 min.

Le pain est démoulé à la sortie du four et laissé refroidir pendant 60 min. On mesure alors son volume à l'aide du système classique utilisant le déplacement de graines de petite taille (colza).

— *Essais de panification types français et européen*

Ils sont réalisés au fournil expérimental à partir de 2 kg et 1 kg de farine respectivement, selon le protocole normalisé pour l'essai français (C.N.E.R.N.A., 1969), ou celui suivi par le Groupe de travail des meuniers de la C.E.E. pour l'essai européen (C.E.E., 1975-1977).

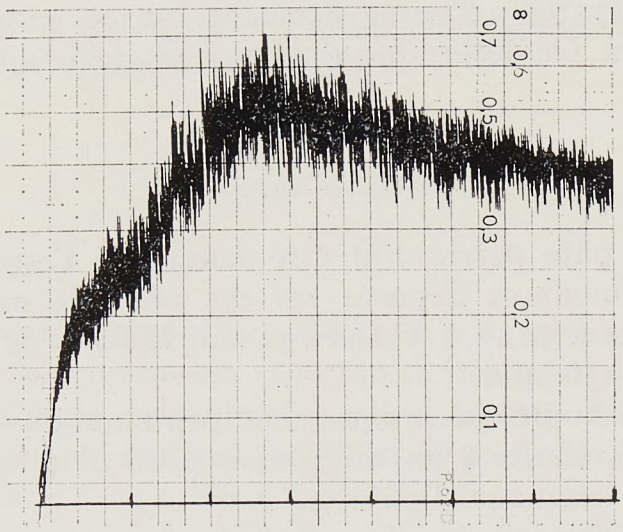
Nous citerons enfin simplement pour mémoire les méthodes classiques (humidité, azote total Kjeldahl et indice Zeleny) qui ont été pratiquées complémentairement.

## Résultats obtenus et discussion

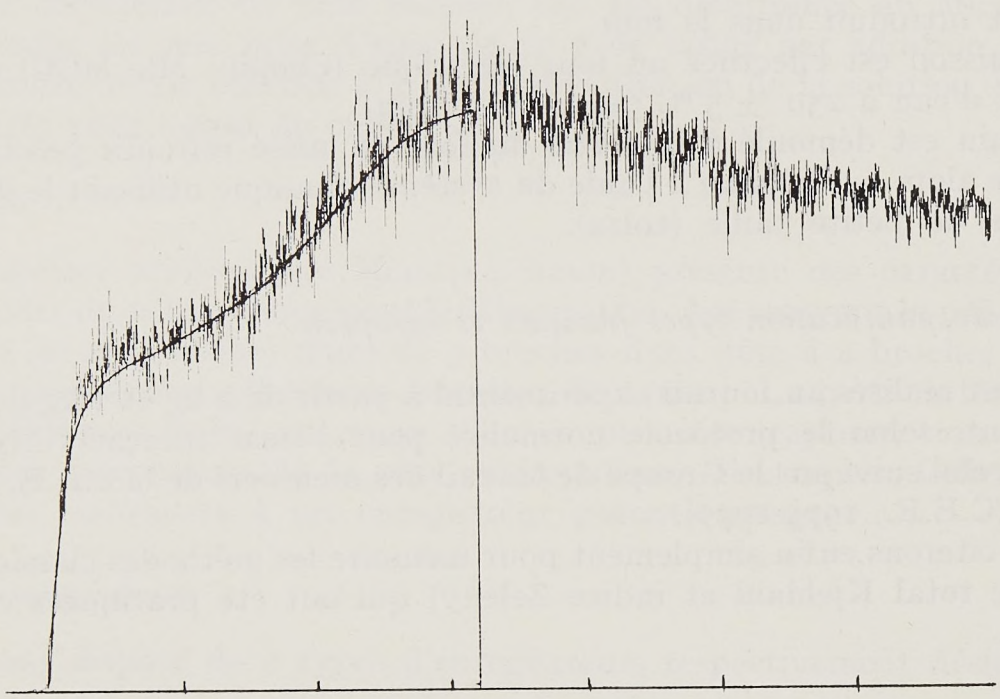
### 1. — *Principales caractéristiques de pétrissage fournies par le Mixographe*

A titre d'exemple, nous rapportons dans la figure 1 les mixogrammes obtenus à l'aide des 2 systèmes d'enregistrement E1 et E2 à partir de la même farine pétrie pendant 7 min.

Bien que les performances des deux enregistreurs soient différentes, les mixogrammes obtenus montrent que dans les deux cas le couple atteint sa valeur maximum après 3 min de pétrissage pour décroître ensuite progressivement. Par contre, la hauteur au sommet prise dans la partie moyenne de la courbe est de 7,5 cm avec E1 et de 10,8 cm avec E2. La surface, délimitée par l'axe des temps, la perpendiculaire abaissée du sommet et la courbe moyenne, est de 24 cm² seulement avec E1 pour passer à 60 cm² avec E2.




E1 S = 24 cm² T = 3 min H = 7,5



E2 S = 60 cm² T = 3,15 min H = 10,8 cm

FIG. 1. — *Mixogrammes obtenus à partir de la même farine à l'aide des enregistreurs E1 et E2.* (Farine 40 g, consistance 350 UB, pétrissage 7 mn).

Dans l'exposé qui va suivre, chaque mixogramme sera donc défini par ces 3 caractéristiques :

T min : temps du pétrissage pour atteindre le couple maximum.

H cm : hauteur de la courbe au couple maximum.

S cm² : surface moyenne au couple maximum.

— Le temps nécessaire pour atteindre le couple maximum, appelé également temps de pétrissage optimum, correspond au stade où la mobilité de la pâte est minimum. Ce temps est d'autant plus important que le développement de la pâte est lui-même plus long et inversement; pour une farine donnée, la pâte sera insuffisamment pétrie si ce temps n'est pas respecté et la qualité du pain en sera amoindrie. La poursuite du pétrissage au-delà du maximum accroît la mobilité et l'extensibilité de la pâte en même temps que sa consistance diminue.

Certains auteurs (Swanson, 1939; Swanson, Johnson, 1943; Shuey, Gilles, 1966) ont d'ailleurs tenu compte de l'angle de pente de la courbe au-delà du pic (dit angle d'affaiblissement) qui est en relation avec la tolérance au pétrissage : cet angle est faible pour les farines très tolérantes; il est d'autant plus prononcé que les farines sont moins tolérantes.

— Comme pour le Farinographe, on considère généralement que la hauteur de la courbe à un temps de pétrissage donné est associée à la consistance de la pâte. Dans la première phase du pétrissage, cette hauteur traduit une résistance progressive de la pâte à l'extension à mesure que se forme le réseau glutineux; elle s'accroît donc plus ou moins rapidement selon les farines jusqu'à atteindre une valeur maximum. Selon certains auteurs (Swanson, Andrews, 1943; Shuey, Gilles, 1966; Finney, Yamazaki, 1967), la hauteur au sommet serait influencée non seulement par la consistance, mais aussi par la teneur en protéines des farines.

— Quant à la surface délimitée par la courbe et la hauteur du mixogramme à un temps de pétrissage donné, elle serait en rapport avec le niveau de force des farines et leur degré de tolérance au pétrissage (Morris, Bode, Heizer, 1944; Sollars, Barrett, 1964; Shuey, Gilles, 1966). La surface au temps T (le plus souvent 6 ou 7 min) s'est en effet révélée d'autant plus importante que la farine était plus forte et que sa tolérance au pétrissage était plus marquée.

Dans cette étude, nous avons tenu compte de la surface au temps de pétrissage optimum. Selon plusieurs auteurs et notamment Swanson (1939), Johnson, Swanson, Bayfield (1943), Harris, Sibbitt, Scott (1945), l'épaisseur de la courbe apporterait également des informations sur la force et la tolérance des farines. En général, les farines fortes et très tolérantes donneraient des courbes épaisses; l'amincissement après le pic traduirait une moindre tolérance de la pâte au pétrissage.

Dans l'exemple rapporté figure 1, l'angle d'affaiblissement et l'épaisseur des courbes expriment une tolérance au pétrissage caractéristique des farines couramment utilisées en panification française.

### 2. — *Influence de l'hydratation*

Les propriétés des pâtes boulangères sont évidemment tributaires de la qualité des farines mises en œuvre, mais aussi de la consistance qu'elles présentent au pétrissage. Cette consistance des pâtes est conditionnée par la capacité propre à chaque farine d'absorber une quantité d'eau plus ou moins importante et l'appréciation tactile du boulanger n'est rien d'autre qu'une estimation subjective de la consistance.

Une première série d'essais a permis de préciser l'influence d'une part du taux d'hydratation des farines sur les caractéristiques des mixogrammes, d'autre part celle de la nature des réactifs entrant dans la composition des pâtes.

Le tableau 1 rassemble les résultats ainsi obtenus à l'aide de l'enregistreur E1.

— On a d'abord examiné une série de 12 variétés de blé d'aptitudes boulangères différentes en déterminant au préalable le taux d'hydratation optimum des farines (prise d'essai 40 g) à l'aide d'une solution saline (ClNa 4 p. 100) de façon à obtenir des pâtes de consistance voisine de 400 UB. Chaque farine a été ensuite additionnée de volumes croissants de la même solution.

Les résultats obtenus, dont les 4 variétés présentées tableau 1 sont une illustration, font apparaître que le temps de pétrissage s'accroît de façon plus ou moins marquée à mesure que s'élève le taux d'hydratation.

TABLEAU I

*Influence de l'hydratation sur les caractéristiques de pétrissage*
(enregistreur E1)

Taux d'hydratation
(40 g farine, ClNa 4 %)

| | Hydr. (%) | T (mn) | H (cm) | S (cm²) | | Hydr. (%) | T (mn) | H (cm) | S (cm²) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Champlein . . . | 56 | 3,30 | 7,5 | 30 | | 56 | 6 | 7,5 | 54 |
| | 58 | 4 | 7,4 | 32 | Capitole . . . | 58 | 6,15 | 7,1 | 49 |
| | 60 | 4,30 | 6,1 | 27,5 | | 60 | 6,45 | 7 | 50 |
| Cappelle . . . | 58 | 4,15 | 8,8 | 45 | | 59 | 8 | 6,9 | 62 |
| | 60 | 4,15 | 8,4 | 39 | Wimax . . . | 61 | 8,30 | 6,3 | 57,5 |
| | 63 | 5 | 7,8 | 39 | | 62 | 8,45 | 5,9 | 57 |

Nature du réactif

| Eau distillée | | | | (40 g farine, 350 UB) | Sol. ClNa 4 % | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hydr. (%) | T (mn) | H (cm) | S (cm²) | | T (mn) | H (cm) | S (cm²) | Hydr. (%) |
| 56 | 2,45 | 7,4 | 26,5 | Blé faible | 2,45 | 8,8 | 32,5 | 56 |
| 57,5 | 3,45 | 7,4 | 35 | Blé courant | 4,15 | 8,8 | 45 | 57,5 |
| 59 | 6 | 6,3 | 49,5 | Blé fort | 8 | 6,9 | 62 | 59 |
| — | 4,30 | 6,5 | 36,8 | Divers ($n$ = 10 moy). | 5 | 7,5 | 43,5 | — |
| Eau distillée | | | | (30 g farine, 300 UB) | Sol. ClNa-sucre-bromate | | | |
| 60 | 1,30 | 3,1 | 5,8 | Blé faible | 2,15 | 4,9 | 12,1 | 60 |
| 61 | 3 | 3,5 | 12 | Blé courant | 3,30 | 5,2 | 16,7 | 61 |
| 60 | 3,30 | 3,4 | 15,5 | Blé courant supérieur | 5 | 4,5 | 22 | 60 |
| | | | | *Lots variétaux* (moy.) : | | | | |
| | 1,25 | 3,6 | 7,5 | Réc. 1974 : $n$ = 9 | 2 | 5,5 | 13,3 | |
| | 2 | 3,8 | 9,3 | Réc. 1975 : $n$ = 16 | 2,45 | 5,2 | 15,6 | |

A l'inverse, la hauteur au sommet de la courbe et la surface intégrant les valeurs T et H, accusent une diminution plus ou moins prononcée.

Néanmoins, chez une variété faible, le temps de pétrissage n'a pas été sensiblement modifié alors que pour une variété forte, hauteur et surface évoluaient dans le sens d'un accroissement.

Dans leur ensemble toutefois, et compte tenu des types de blés examinés, nos observations sur les variations de T et H s'accordent avec celles antérieurement

rapportées par Swanson et Andrews (1945), Shuey et Gilles (1966), pour des blés à taux de protéines élevés (13,8 à 15,6 p. 100) et pour des gammes d'hydratation plus larges (60 à 80 p. 100). Plus récemment, Hoseney et Finney (1974), Baig, Hoseney (1977), ont confirmé qu'un accroissement de l'hydratation déterminait un accroissement de T et une diminution de H, en précisant qu'une hydratation insuffisante pouvait diminuer la durée de pétrissage.

— Une autre série d'essais a eu pour but de préciser les modifications éventuellement apportées aux mixogrammes en utilisant comme réactif d'hydratation soit de l'eau distillée, soit une solution saline, soit la solution sel-sucre-bromate utilisée pour les essais de cuisson.

Les résultats du tableau 1 montrent que la présence de ClNa dans la pâte a tendance à accroître le temps de pétrissage et provoque un accroissement de 15 à 20 p. 100 des hauteurs au sommet et de 20 à 25 p. 100 des surfaces.

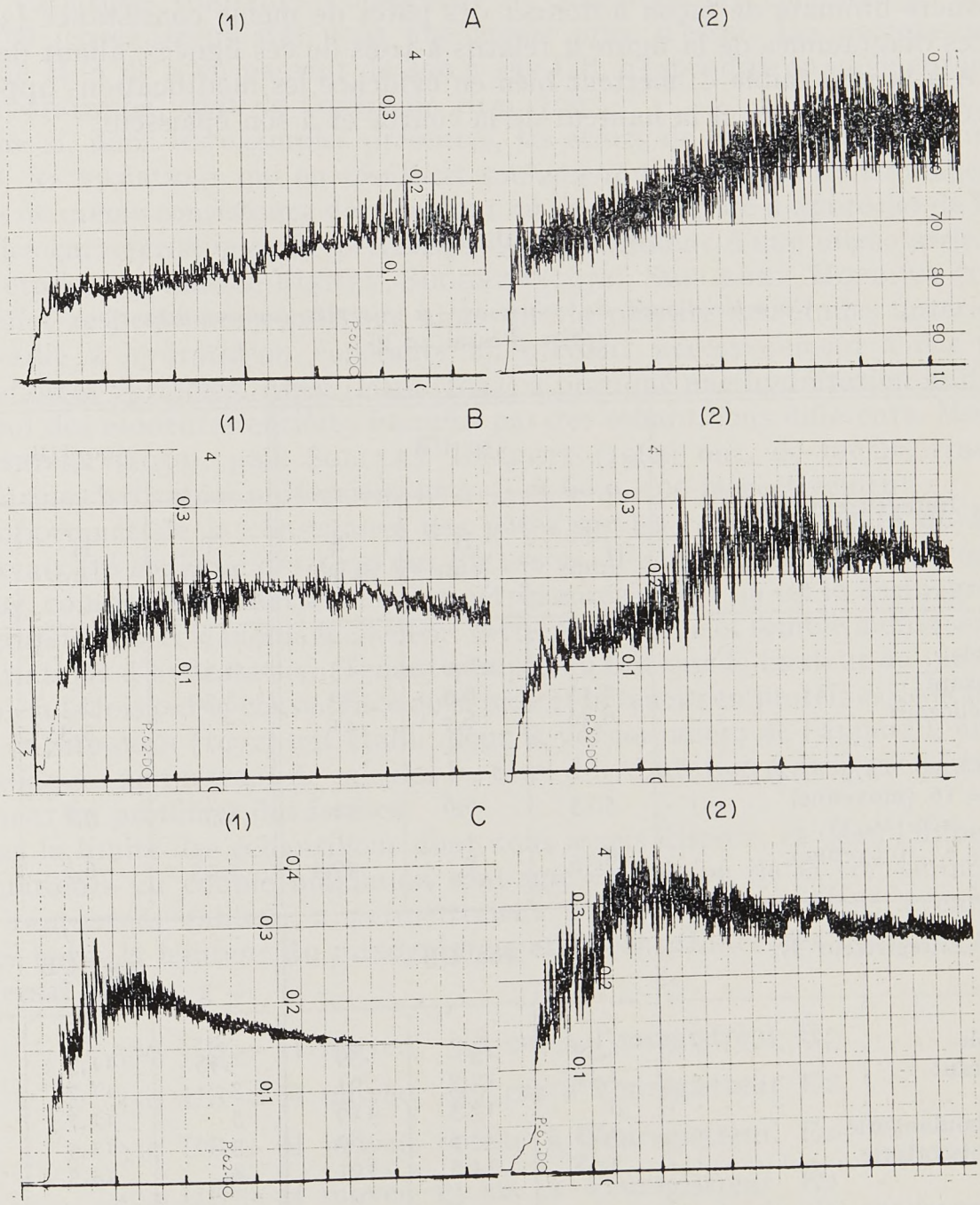



Fig. 2. — *Mixogrammes de 3 lignées A-B-C avec hydratations comparées par l'eau* (1) *et la solution « test de cuisson »* (*ClNa-sucre-bromate*) (2).
(Enregistreur E1, prise 30 g, consistance 350 UB, pétrissage 6,30 mn).

Pour des conditions expérimentales différentes (prise d'essai et consistance plus faibles), on observe des variations similaires lorsque la pâte est additionnée de la solution sel-sucre-bromate, l'accroissement moyen de H et S étant encore plus marqué et supérieur à 50 p. 100.

Dès 1945, JOHNSON et SWANSON signalaient que, parmi les divers composants de la pâte, ClNa exerçait l'influence la plus marquée sur les caractéristiques des mixogrammes, alors que celle de la levure, du sucre et du malt était faible et que le bromate restait sans effet. Plus récemment, SANCHEZ, HOSENEY, MORITZ (1973) et HOSENEY, FINNEY (1974) ont précisé que la présence de ClNa accroît la consistance de la pâte et en conséquence sa résistance à l'extension. Ces modifications se traduisent par un accroissement de la hauteur du mixogramme au sommet et un épaississement de la courbe au-delà du pic. La figure 2 illustre les modifications des mixogrammes que nous avons nous-mêmes observées en comparant différentes lignées dont les farines (30 g) ont été hydratées soit par l'eau soit par la solution ClNa-sucre-bromate de façon à donner des pâtes de même consistance (350 UB).

Les diagrammes de la figure 2 relatifs à trois de ces lignées, allant de la plus forte A à la plus faible C, mettent bien en évidence les modifications apportées à la durée de pétrissage, à la hauteur de la courbe et à son épaisseur.

TABLEAU 2

*Caractéristiques de pétrissage à diverses consistances*
(prise d'essai 40 g)

| Enregistreur E1 | 350 UB | | | 300 UB | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | T (mn) | H (cm) | S ($cm^2$) | T (mn) | H (cm) | S ($cm^2$) |
| Blé faible | 2 | 6,9 | 13 | 1,30 | 6,5 | 11,5 |
| Blé courant | 2,45 | 6,3 | 20 | 3,30 | 5 | 20,5 |
| Blé améliorant | 6,30 | 6,7 | 41 | 7 | 5,3 | 38 |
| *Variétés* (réc. 1973-1974) : $n = 16$ (moyenne) | 5,15 | 6,6 | 34 | 5,30 | 5,8 | 32 |
| (réc. 1973) : $n = 8$ (moyenne) | 6,15 | 7 | 40,4 | 6,45 | 6,2 | 40,5 |
| **Enregistreur E2** | **400 UB** | | | **350 UB** | | |
| Blé faible | 1,30 | 13 | 39 | 1,45 | 11,3 | 34,5 |
| Blé courant | 2,30 | 12,7 | 61 | 3 | 11,7 | 58,5 |
| Blé fort | 5 | 12,5 | 110 | 5 | 11,7 | 88 |
| Farine boulangerie | 2,45 | 12,5 | 80 | 3,30 | 11,5 | 70 |
| Farine biscotterie | 3,45 | 14,5 | 101 | 4 | 14,5 | 95 |
| *Lots commerciaux* (réc. 1975) : $n = 10$ (moyenne) | 2,30 | 12,5 | 58,1 | 2,45 | 11,3 | 52,8 |

### 3.A. — *Variations des caractéristiques de pétrissage selon la consistance*

Complétant les résultats précédents, le tableau 2 rapporte les observations effectuées sur plusieurs séries d'échantillons d'années de récolte différentes dont les mixogrammes ont été établis à l'aide de l'un ou l'autre des systèmes enregistreurs à des consistances comprises entre 300 et 400 UB.

En travaillant comparativement à 300 et 350 UB (enregistreur E1), on vérifie qu'une plus faible consistance de la pâte s'accompagne d'un accroissement du temps de pétrissage (blé faible excepté) et inversement, d'une diminution de la hauteur (20 p. 100 environ en moyenne) et à un degré moindre, de la surface (7 p. 100 env.).

Des variations similaires s'observent en comparant les consistances de 350 et 400 UB (enregistreur E2) pour une même prise d'essai. Les accroissements moyens de H et de S en passant de 400 à 350 UB, c'est-à-dire en augmentant les taux d'hydratation, sont de l'ordre de 10 p. 100.

Même si, dans les exemples présentés, les écarts de consistance sont limités à 50 UB, les variations qui en résultent soulignent la nécessité de travailler sur des pâtes de même consistance dès l'instant où l'on se propose d'apprécier de façon relative les caractéristiques de pétrissage des échantillons d'une même série.

Les études récentes de FINNEY, SHOGREN (1972), SHROEDER, HOSENEY (1976), ont en effet respecté ces conditions alors que la plupart des études antérieures ont travaillé à hydratation constante aboutissant nécessairement à des pâtes de consistances variables. Ainsi LAMB (1944) a pratiqué une hydratation uniforme (57 p. 100) des moutures entières fournies par des échantillons différents. MORRIS, BODE, HEIZER (1944), puis SOLLARS, BARRETT (1964) ont, de même, travaillé sur des farines hydratées uniformément à 54 et 60 p. 100 respectivement.

L'importance de la consistance des pâtes sur les caractéristiques du Mixographe avait été souligné dès 1939 par SWANSON. Il n'en est pas moins désormais admis que, comparativement à cet autre pétrin enregistreur qu'est le Farinographe, le Mixographe apprécie moins facilement cette consistance et semble moins sensible à des variations d'hydratation. Tenant compte du fait que la hauteur au pic serait influencée à la fois par la consistance de la pâte et la teneur en protéines de la farine, FINNEY et SHOGREN (1972) ont établi, pour la version micro de l'appareil, un système d'abaques permettant de calculer les taux d'hydratation à utiliser en fonction de la teneur en protéines des farines.

Dans la limite des échantillons dont nous avons disposé, et dans l'hypothèse où les hauteurs au couple maximum sont une expression de la consistance, les valeurs rapportées tableau 2 permettraient d'établir les relations éventuelles suivantes entre la hauteur du mixogramme et la consistance des pâtes, pour une prise d'essai de 40 g :

300 UB → H moyen 5,8 cm à l'enregistreur E1

350 UB → H moyen 6,7 cm à l'enregistreur E1

350 UB → H moyen 12 cm à l'enregistreur E2

400 UB → H moyen 13 cm à l'enregistreur E2

Bien que limitées, ces différences semblent se situer en dehors des erreurs expérimentales et en conséquence, peuvent être considérées comme significatives.

### 3.B. — *Variations des caractéristiques de pétrissage selon le type d'enregistreur*

Si les données du Mixographe sont influencées par la consistance des pâtes, elles le sont de même par l'importance de la prise d'essai et, bien évidemment, par les performances du système d'enregistrement utilisé.

C'est ce que nous avons tenté de montrer par les résultats rassemblés dans le tableau 3.

Pour ce qui concerne la prise d'essai, la plupart des utilisateurs du Mixographe ont travaillé sur 35 g de farine ou de mouture totale (MORRIS, BODE, HEIZER 1944; LAMB, 1944; SOLLARS, BARRETT, 1964). Plus rares sont ceux qui ont utilisé un échantillon de 30 g (SHUEY, GILLES, 1966).

TABLEAU 3

*Comparaison des caractéristiques de pétrissage entre les deux systèmes d'enregistrement* (consistance 350 UB)

| | Enregistreur E1 | | | Enregistreur E2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 7,3 cm → 5 000 g/cm<br>1,5 cm → 1 mn | | | 10 cm → 5 000 g/cm<br>2,5 cm → 1 mn | | |
| | T1 (mn) | H1 (cm) | S1 (cm²) | T2 (mn) | H2 (cm) | S2 (cm²) |
| *Prise d'essai* (30 g) : | | | | | | |
| Blé biscuiterie | 2 | 5,8 | 13,5 | 2 | 8,7 | 32 |
| Blé boulangerie | 3,15 | 5,5 | 17,2 | 3 | 8,2 | 45 |
| Blé biscotterie | 4,15 | 6 | 28 | 3,45 | 8,5 | 75 |
| Blé améliorant | 5,45 | 5,6 | 32 | 5,45 | 8,7 | 83 |
| *Variétés* (réc. 1975) : | | | | | | |
| $n = 13$ (moyennes) | 2,30 | 5,6 | 16,7 | 2,30 | 9 | 39 |
| *Lots commerciaux* (réc. 1975) : | | | | | | |
| $n = 9$ (moyennes) | 3 | 5,8 | 19 | 2,45 | 9,8 | 44 |
| *Prise d'essai* (40 g) : | | | | | | |
| Blé biscuiterie | 1,45 | 7,7 | 16,5 | 1,45 | 12 | 43,5 |
| Blé boulangerie | 3,15 | 7,8 | 26 | 3,15 | 11 | 64 |
| Blé biscotterie | 3,45 | 8,1 | 36 | 3,45 | 11,5 | 93 |
| Blé améliorant | 4,45 | 8 | 45 | 5 | 10,9 | 104 |
| *Variétés* (réc. 1974) | | | | | | |
| $n = 23$ (moyennes) (300 UB) | 4,45 | 6,4 | 29,8 | 3,15 | 14,9 | 70 |

S2 (30 g, 350 UB) → S1 (30 g, 350 UB) $n = 25$ $r = 0,94$

(*a*) $S2 = 2,6 \times S1 - 2$

S2 (40 g, 400 UB) → S1 (30 g, 350 UB) $n = 16$ $r = 0,94$

(*b*) $S2 = 4 \times S1 - 1$

Les résultats du tableau 3 concernent 4 farines de propriétés différentes et des séries de variétés ou de lots commerciaux. Ils permettent de comparer :

— d'une part les caractéristiques de pétrissage obtenues avec un même enregistreur à partir de prises d'essai de 30 et 40 g;

— d'autre part les variations observées entre les 2 systèmes d'enregistrement utilisés.

a) *Prise d'essai*

— *pour E1* : L'importance de la prise d'essai ne semble pas avoir d'influence marquée sur le temps de pétrissage, qui reste sensiblement constant entre 30 et 40 g pour chaque type de farine. Il semble toutefois qu'une prise de 40 g tendrait à diminuer cette durée, notamment pour le blé améliorant (5,45 à 4,45), indice probable dans ce cas d'une plus grande efficacité du pétrissage.

En revanche H et S sont modifiés de façon importante en portant le poids de farine testée de 30 à 40 g; pour les 4 blés considérés, l'accroissement moyen est de 38 p. 100 pour H, de 36 p. 100 pour S;

— *pour E2* : Le temps de pétrissage demeure également sensiblement constant, avec encore une diminution de 45 s pour le blé améliorant. Les accroissements moyens de H et S sont du même ordre qu'avec E1, soit respectivement 33 et 30 p. 100.

Pour chacun des 2 enregistreurs, le fait de porter la prise d'essai de 30 à 40 g ne modifie donc pas sensiblement les temps de pétrissage, mais accroît les valeurs de H et S d'environ un tiers.

b) *Comparaison des deux enregistreurs*

Pour une même prise d'essai, le temps de pétrissage propre à chaque farine n'est pas modifié. En revanche, et du fait de performances différentes, l'enregistreur E2 conduit à des valeurs de H et S plus élevées que celles fournies par E1.

Pour les 4 blés, l'accroissement moyen de H est de 49 p. 100 avec une prise de 30 g, de 43 p. 100 pour une prise de 40 g. Les variations de S, encore plus marquées, sont de l'ordre de 125 p. 100, que la prise d'essai soit de 30 ou 40 g.

L'interprétation des valeurs de surface obtenues à partir d'une série de 25 échantillons et pour une même prise d'essai (3 0 g) a fait apparaître une corrélation élevée entre S2 et S1 ($r = + 0{,}94$) exprimée par l'équation (*a*) de la droite de régression rapportée tableau 3.

Appliqué à une autre série de 16 échantillons, testés sur E2 à 400 UB à partir de 40 g de farine comparativement à E1 à 350 UB et 30 g de farine, le calcul a également montré que les valeurs de S étaient associées par une corrélation de $r = + 0{,}94$, exprimée par l'équation de régression (*b*).

## 4.A. — *Caractéristiques des principales variétés de blé tendre*

Le tableau 4 regroupe les valeurs mixogrammes T et S des principales variétés françaises, comparativement aux volumes des pains obtenus en cuisson miniaturisée, ainsi que diverses autres caractéristiques telles que taux d'hydratation, teneurs en protéines et indices Zeleny.

TABLEAU 4

*Comportement au pétrissage et à la cuisson et autres caractéristiques des principales variétés de blé*

| Variétés | Récolte 1974 | | | | | | Récolte 1975 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mixogramme (*) | | Volume Pain | Hydr. farines | Prot. grains | Zeleny | Mixogramme (**) | | Volume Pain | Hydr. Farines | Prot. Grains | Zeleny |
| | T (mn) | S ($cm^2$) | (ml/100 g farine) | (%) | (% ms) | (mm) | T (mn) | S ($cm^2$) | (ml/100 g farine) | (%) | (% ms) | (mm) |
| Clément | 1,30 | 6,7 | 400 | 59 | 9,4 | 12 | 1,30 | 27 | 300 | 57,5 | 14,1 | 18 |
| Maris Huntsmann | 1,30 | 8,7 | 365 | 61 | 13,9 | 25 | 1,15 | 28 | 400 | 55,5 | 12,4 | 23 |
| Etoile Choisy | 2,30 | 15 | 665 | 63 | 13,4 | 21 | 1,30 | 50 | 450 | 55,5 | 12,4 | 13 |
| Joss | 2,45 | 15,4 | 535 | 61 | 11,1 | 21 | 1,30 | 58 | 550 | 56 | 12,3 | 23 |
| Champlein | 2,30 | 16,6 | 565 | 58 | 11,8 | 17 | 2,30 | 58 | 575 | 58 | 15,1 | 30 |
| Talent | 2,15 | 14,2 | 565 | 64 | 12,7 | 22 | 3 | 62 | 600 | 57 | 13,9 | 28 |
| Top | 2,30 | 18,2 | 700 | 64 | 12,6 | 30 | 2,30 | 70 | 650 | 58,5 | 13,2 | 37 |
| Capitole | 5 | 26 | 765 | 62 | 11,8 | 27 | 5,30 | 109 | 750 | 56 | 12,2 | 25 |
| Hardi | 5 | 24,5 | 775 | 63 | 11,7 | 34 | 5,15 | 105 | 825 | 62 | 13,3 | 54 |
| Florence Aurore | 5,3c | 30 | 825 | 71 | 13,1 | 34 | 5,30 | 124 | 900 | 65 | 15 | 45 |

(*) Enregistreur E1, 30 g — 350 UB.
(**) Enregistreur E 2, 40 g — 400 UB.

Les 10 variétés rapportées sont bien représentatives des différents niveaux de qualité de la production française, allant des blés non panifiables du type Clément aux blés de force améliorants du type Florence-Aurore, en passant par les variétés faibles (type Joss) et celles donnant satisfaction en boulangerie (type Capitole).

Nos observations ont porté sur 2 années de récolte; les résultats 1974 ont été obtenus avec l'enregistreur E1 pour une prise de 30 g (350 UB); ceux de 1975, à l'aide de l'enregistreur E2 pour une prise de 40 g (400 UB).

Les temps de pétrissage au mixographe sont compris entre 1,30 et 5,30 min, et à quelques exceptions près (blés faibles), restent pratiquement inchangés d'une récolte à l'autre pour la même variété.

Les valeurs de S se répartissent selon une échelle propre à chaque enregistreur : entre 6,7 et 30 $cm^2$ pour E1 (réc. 1974), entre 27 et 124 $cm^2$ pour E2 (réc. 1975). Le calcul selon (*b*) montre qu'elles n'accusent pas de variations très marquées d'une année à l'autre pour la même variété. De même, les volumes des pains qui évoluent entre 400 et 825 ml pour la récolte 1974, entre 300 et 900 ml pour 1975, demeurent, pour chaque variété, assez comparables d'une année à l'autre.

La consistance plus faible (350 UB) utilisée pour les essais de 1974 explique que les taux d'hydratation (58 à 71) soient inférieurs à ceux des essais 1975 (55,5 à 65) effectués à 400 UB.

Pour ce qui concerne la teneur en protéines, et contrairement à ce qui s'observe chez certains pays grands producteurs, on notera qu'elle ne constitue pas un critère de qualité boulangère suffisamment significatif dans le cas des blés français. Les valeurs rapportées tableau 4 montrent en effet que des blés faibles comme Étoile de Choisy ou non panifiables comme Maris Huntsmann peuvent présenter des teneurs en protéines égales et même supérieures à celles de blés de très bonne qualité boulangère comme Hardi ou améliorants comme Florence-Aurore.

L'indice Zeleny, lui-même soumis à l'influence quantitative des protéines, peut dans certains cas, conduire à des appréciations erronées. C'est ainsi que des variétés non panifiables comme Clément et Maris Huntsmann présentent des Zeleny de valeur égale ou supérieure à celles de blés du type Joss ou Champlein qui, bien que faibles, demeurent panifiables.

### 4.B. — *Caractéristiques de divers blés de force*

Complémentairement aux résultats précédents, le tableau 5 rassemble des informations relatives à divers blés de force, français et étrangers, récoltés en 1972 et 1974.

Parmi les blés français cités, seules les variétés de printemps Rex et Florence Aurore (cf. tabl. 4) font encore l'objet d'une culture restreinte, du fait de leur rendement insuffisamment élevé. Quant aux variétés d'origine étrangère, elles ont été multipliées en France à titre purement expérimental.

De tels blés se caractérisent par un temps de pétrissage élevé, compris entre 5 et 12 min pour la récolte 1972, entre 4 et 8 min pour la récolte 1974.

Comparées à celles rapportées tableau 4 (réc. 1974, moy. 17,5 $cm^2$), les surfaces des mixogrammes sont elles-mêmes plus élevées, avec une moyenne de 40 pour la récolte 1972, de 38,5 pour 1974.

Il en est de même du volume des pains, compris entre 825 (Martonvasari) et 1 050 ml (Purcari Host.) pour la série 1972, entre 750 et 920 ml pour celle de 1974.

TABLEAU 5

*Comportement au pétrissage et à la cuisson et autres caractéristiques de divers blés de force*

| | Récolte 1972 | | | | | | Récolte 1974 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mixogramme (*) | | Volume | Hydr. farines | Prot. grains | Zeleny | Mixogramme (*) | | Volume | Hydr. farines | Prot. grains |
| | T (mn) | S (cm²) | Pain (ml/100 g farine) | (%) | (% ms) | (mm) | T (mn) | S (cm²) | Pain (ml/100 g farine) | (%) | (% ms) |
| *Variétés françaises :* | | | | | | | | | | | |
| Rex | 6,30 | 38 | 850 | 66 | 14,2 | 37 | 6,30 | 41 | 800 | 64 | 15,4 |
| Poncheau | 5 | 32 | 865 | 67 | 14,6 | 39 | 4,30 | 30 | 800 | 65 | 16,7 |
| Wimax | 7,30 | 39 | 900 | 66 | 13,7 | 38 | 5,30 | 42 | 915 | 65 | 15,4 |
| Magdalena | 6 | 41 | 975 | 67 | 14,3 | 42 | 5 | 34,5 | 900 | 65 | 16,6 |
| Panis | 7 | 41 | 975 | 65 | 13,2 | 40 | 5,30 | 40 | 835 | 64 | 15,7 |
| *Variétés étrangères :* | | | | | | | | | | | |
| Bezostaia | 7 | 32 | 900 | 70 | 13,9 | 45 | 5,30 | 29 | 775 | 67 | 14 |
| Novisad | 5 | 34 | 850 | 67 | 16,9 | 45 | 5 | 34 | 865 | 65 | 14,4 |
| Martonvasari | 6,30 | 35 | 825 | 71 | 16,3 | 63 | 5 | 31 | 750 | 68 | 16,7 |
| Mexique 50 | 6,30 | 35 | 950 | 72 | 19 | 45 | 4 | 36 | 835 | 68 | 17,4 |
| Mayo | 5,30 | 37 | 900 | 65 | 15 | 40 | 4 | 36 | 835 | 62 | — |
| Pembina | 8,30 | 49 | 1 010 | 66 | 15,4 | 56 | 7 | 48 | 885 | 63 | 17,3 |
| Purcari Host | 12 | 67 | 1 050 | 64 | 15,6 | 57 | 8 | 61 | 920 | 63 | 22,1 |

(*) Enregistreur E 1, 40 g — 350 UB.

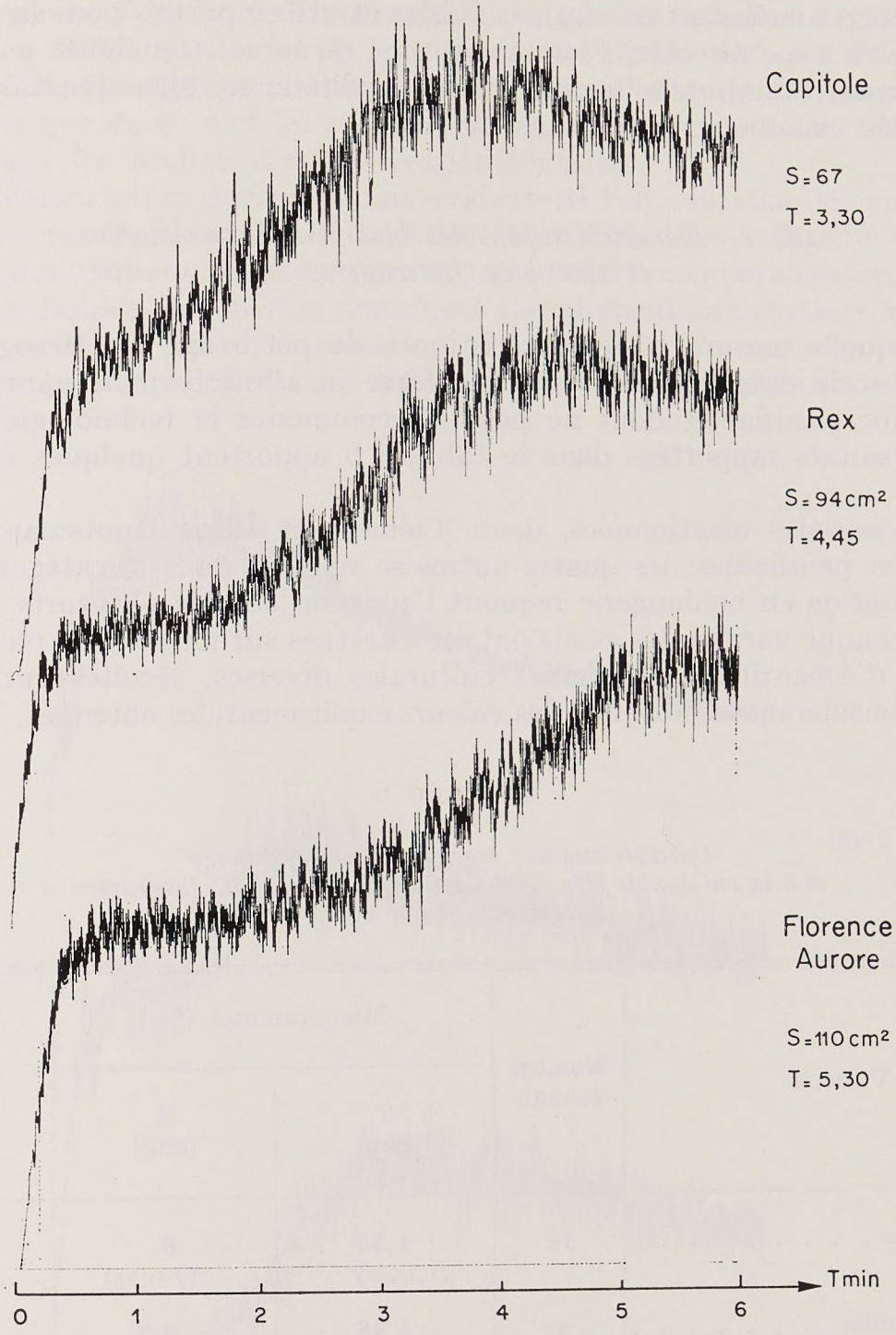



FIG. 3. — *Mixogrammes comparés de 3 variétés : Capitole (blé de boulangerie), Magdalena et Florence-Aurore (blés améliorants)* (Enregistreur E2. farine 40 g, consistance 350 UB, pétrissage 6 mn).

Le niveau de force des blés examinés semble d'ailleurs avoir subi un certain amoindrissement à la récolte 1974 par rapport à celle de 1972 : on observe en effet que le temps moyen de pétrissage passe de 7 à 5,30 min, la surface moyenne de 40 à 38,5 cm² et le volume des pains de 920 à 845 ml. On peut voir là une influence possible des facteurs climatiques.

En 1974, les teneurs en protéines sont de même plus élevées (moy. 16,5) qu'en 1972 (moy. 15,1) où l'indice Zeleny varie de 37 à 63. On note cependant des taux d'hydratation plus faibles en 1974 (moy. 65) qu'en 1972 (moy. 67) bien que les pâtes examinées aient la même consistance.

La figure 3 illustre l'aspect des mixogrammes fournis par 3 variétés françaises de différents niveaux de force : Capitole, donnant de bons résultats en panification

française, Rex, améliorant des farines faibles et utilisé parfois pour la fabrication de produits de type biscotte, Florence-Aurore, de force trop élevée pour la panification courante mais très bonne variété améliorante, bien que surpassée par certains blés canadiens, américains et russes.

### 4.C. — *Caractéristiques des blés faibles panifiables et des blés fourragers*

Dans quelle mesure les caractéristiques de pétrissage au Mixographe permettent-elles de différencier les blés de force insuffisante mais panifiables, des blés dits non panifiables dont ne peut s'accommoder la technologie française?

Les résultats rapportées dans le tableau 6 apportent quelques éléments de réponse.

Des 6 variétés mentionnées, deux (Clément et Maris Huntsmann) sont reconnues non panifiables; les quatre autres se rangent dans la catégorie des blés dont l'utilisation en boulangerie requiert l'addition de blés plus forts.

Pour chaque variété, les essais ont été effectués sur un nombre plus ou moins important d'échantillons, d'origines culturales diverses, récoltés entre 1972 et 1975. En considérant la moyenne des valeurs expérimentales obtenues, on constate

TABLEAU 6

*Caractéristiques moyennes au pétrissage et à la cuisson de blés faibles panifiables et de blés fourragers*
(récoltes 1972 à 1975)

| Variétés | Nombre échant. | Mixogrammes (*) | | Volumes des pains (ml/100 g farine) |
|---|---|---|---|---|
| | | T (mn) | S ($cm^2$) | |
| Clément | 12 | **1,35** (1,15-2) | **8** (7-9,75) | **381** (265-435) |
| Maris Huntsman | 27 | **1,35** (0,45-2,30) | **9,7** (6,7 — 14) | **398** (265-500) |
| Etoile Choisy | 10 | **1,55** (1,30-2,30) | **11,1** (8-15) | **547** (465-665) |
| Joss | 16 | **2,25** (1,45-3) | **13,7** (11-16,5) | **546** (435-700) |
| Talent | 15 | **2,25** (1,30-3) | **15,8** (11-20) | **621** (535-735) |
| Champlein | 17 | **2,30** (2-3,15) | **15,8** (12-19) | **690** (500-765) |

Caractères gras : valeurs moyennes; entre parenthèses : valeurs extrêmes.
(*) Enregistreur E 1, 30 g — 350 UB.

que les données T et S du Mixographe ainsi que les volumes de pains rendent possible une différenciation entre les 2 catégories de blé. On note toutefois, dans le cas de Maris Huntsmann et Etoile de Choisy, que les temps moyens de pétrissage ne diffèrent que de 20 s et les surfaces de 2,5 cm² seulement. Or, ces différences entrent dans les limites d'erreurs expérimentales.

La différenciation devient moins évidente si l'on considère les valeurs maximum obtenues. On a en effet trouvé des échantillons des 2 variétés indésirables réclamant des temps de pétrissage de 2 et 2,30 min, très comparables à ceux observés sur des blés faibles. Les mêmes remarques s'appliquent aux surfaces qui semblent toutefois permettre une discrimination plus marquée. Ce sont, en définitive, les volumes de pains qui offrent les différenciations les plus significatives.

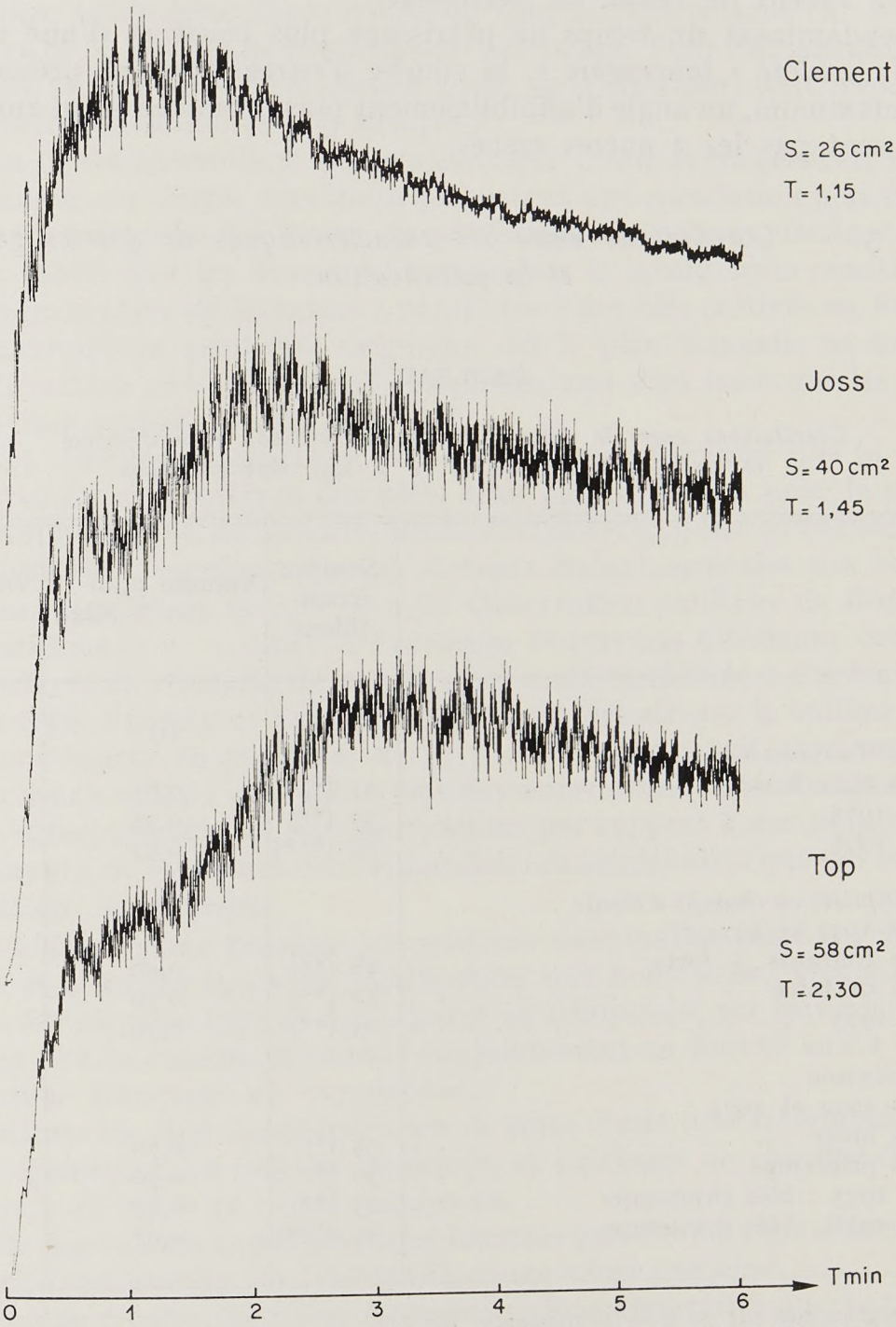



FIG. 4. — *Mixogrammes de 2 variétés panifiables* (JOSS-TOP) *et d'une variété non panifiable* (CLÉMENT).
(Enregistreur E2, farine 40 g, consistance 350 UB, pétrissage : 6 mn).

En dépit des incertitudes qui peuvent subsister dans les cas limites, l'essai au Mixographe, par sa miniaturisation et sa facilité de réalisation, offre néanmoins une possibilité non négligeable de différenciation entre blés panifiables et non panifiables. Il n'en reste pas moins que l'essai de cuisson miniaturisé offre une plus grande sécurité dans la différenciation. On peut donc concevoir que, dans les cas limites ou litigieux, il puisse être mis en œuvre complémentairement à un test de pétrissage. De toute façon, les informations fournies par l'un ou l'autre essai apparaissent plus rigoureuses et plus fiables que celles offertes par le procédé officiel consistant à apprécier plus ou moins subjectivement le caractère « collant » ou « non collant » des pâtes.

La figure 4, où sont regroupés les mixogrammes caractéristiques d'une variété non panifiable et de 2 variétés faibles, apporte d'ailleurs un argument complémentaire en faveur de l'essai de pétrissage.

Indépendamment du temps de pétrissage plus court et d'une surface plus faible de la variété « fourragère », la courbe d'enregistrement présente, au-delà du couple maximum, un angle d'affaiblissement plus prononcé et un amincissement que n'accusent pas les 2 autres tracés.

## 5. — *Corrélations entre les caractéristiques de pétrissage et la panification*

TABLEAU 7

*Corrélations entre le volume des pains (cuisson miniaturisée) et les caractéristiques S et T des mixogrammes*

| | Nombre échantillons | Volume pain → S Mixo. | Volume pain → T Mixo. |
|---|---|---|---|
| | | (*r*) | (*r*) |
| *Lots variétaux du commerce :* | | | |
| Récoltes 1972 à 1975 | 51 (*) | 0,85 | 0,78 |
| Récolte 1975 | 37 (**) | 0,75 | 0,77 |
| Récolte 1976 | 82 (***) | 0,82 | 0,81 |
| *Variétés multipliées en champs d'essais :* | | | |
| Récoltes 1972 et 1974 : | | | |
| blés courants + forts | 48 (**) | 0,50 | 0,54 |
| blés de force | 32 (**) | 0,70 | 0,65 |
| Récolte 1975 | 23 (**) | 0,79 | 0,65 |
| *Lignées de sélection :* | | | |
| Récoltes 1972 et 1974 : | | | |
| blés hiver | 33 (*) | 0,70 | 0,68 |
| blés printemps | 30 (*) | 0,70 | 0,53 |
| Récolte 1975 : blés printemps | 25 (**) | 0,87 | 0,74 |
| Récolte 1976 : blés printemps | 56 (***) | 0,62 | 0,55 |

(*) Mixogrammes sur 30 g — Consistance 350 UB.
(**) Mixogrammes sur 40 g — Consistance 350 UB.
(***) Mixogrammes sur 40 g — Consistance 400 UB.

Plusieurs centaines d'échantillons, de nature et d'origines culturales différentes et d'aptitudes technologiques très diversifiées, ont été examinés conjointement au Mixographe et en cuisson miniaturisée entre 1972 et 1976.

Le tableau 7 fait état des différentes corrélations qui ont pu être ainsi établies entre les valeurs T et S des mixogrammes et les volumes des pains. Toutes ces corrélations sont significatives.

Elles sont élevées pour la série des 51 lots variétaux de l'ensemble des 4 années 1972 à 1976, comme pour celle des 82 échantillons de la seule année 1976 et des 25 lignées de printemps de la récolte 1975, bien que les essais aient été effectués sur des prises d'essai et à des consistances différentes.

Compte tenu du nombre d'échantillons examinés, les corrélations sont moins élevées dans d'autres séries. Pour les 48 variétés de la récolte 1972, formant un échantillonnage hétérogène, les corrélations sont respectivement de + 0,50 pour les surfaces et de + 0,54 pour les temps de pétrissage. Pour l'échantillonnage plus homogène des 32 blés forts de la récolte 1974, les corrélations sont respectivement de + 0,70 (surfaces) et de + 0,65 (temps).

Il ressort de cet ensemble d'informations que, d'une façon générale les surfaces des mixogrammes au couple maximum présentent une corrélation plus élevée avec les volumes de pains que les temps de pétrissage eux-mêmes. De toute façon, il semble bien établi que les données fournies par le mixographe constituent une expression significative de la valeur « panifiable » des blés cultivés en France.

Ces constatations, peut-être originales sur le plan français, ne sont en fait qu'une confirmation des conclusions auxquelles sont déjà parvenus les céréalistes étrangers ayant utilisé le Mixographe.

Dès 1943, JOHNSON, SWANSON, BAYFIELD, avaient montré que le volume du pain (et la teneur en protéines des blés) était en corrélation avec la surface des mixogrammes. Le travail de MORRIS, BODE, HEIZER (1944) sur 29 variétés cultivées en 9 lieux différents, concluait que les surfaces étaient associées aux volumes des pains par une corrélation de $r = + 0{,}72$. Observation similaire de BODE en 1954 sur 11 échantillons ($r = + 0{,}64$). A l'occasion de travaux ultérieurs, cette relation associant surfaces et résultats de panification a été confirmée à plusieurs reprises.

De leur côté, FINNEY et SHOGREN (1972) ont signalé que le volume des pains, rapporté à une teneur en protéines de 13 p. 100, augmentait avec un temps de pétrissage compris entre 1 et 3 min, pour demeurer sensiblement constant au-delà de 3 min. L'interprétation de ces observations par rapport à nos propres résultats doit tenir compte de la nature des échantillons examinés ainsi que des technologies de panification pratiquées.

C'est d'ailleurs pour préciser les relations éventuelles entre les données du Mixographe et d'autres types de panification que nous avons comparé certains échantillons des récoltes 1975 et 1976, testés au laboratoire sur leur comportement au pétrissage et à la cuisson et soumis conjointement au fournil aux 2 techniques de panification française et européenne.

Les résultats les plus caractéristiques de cette étude sont rassemblés tableau 8 où figurent également les valeurs moyennes et extrêmes de chacune des 2 séries 1975 ($n = 36$) et 1976 ($n = 20$) analysées.

L'échelle des valeurs expérimentales fournies par chaque type d'essai témoigne de la diversité qualitative de l'échantillonnage ainsi examiné.

Pour chaque récolte, les valeurs moyennes font apparaître que la panification française conduit aux volumes de pains les plus élevés (750 et 831 ml), l'essai européen aux volumes les plus faibles (484 et 434 ml), la cuisson miniaturisée à des volumes intermédiaires (654 et 618 ml).

TABLEAU 8

*Aptitude des blés à la panification appréciée par le Mixographe comparativement à 3 types d'essais de cuisson*

| Variétés | Mixographe (*) | | Essais de cuisson | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | T (mn) | S (cm²) | Miniaturisé sélection (ml/100 g farine) | Type français (ml/100 g farine) | Type européen (ml/100 g farine) |
| *Récolte 1975 :* | | | | | |
| Kolibri-Rex (60/40) | 5,15 | 103 | 825 | 820 | 628 |
| Capitole | 3 | 78 | 775 | 855 | 575 |
| Capitole-Hardi (50/50) | 3,15 | 67 | 750 | 770 | 485 |
| Top | 3,15 | 56 | 650 | 790 | 650 |
| Champlein | 1,45 | 35 | 550 | 645 | 460 |
| Maris Huntsmann | 1,15 | 28 | 400 | 600 | 465 |
| Clément-Maris H. (50/50) | 1,30 | 26 | 425 | 520 | 340 |
| Ensemble $n = 36$ : | | | | | |
| Moy. | 2,20 | 51 | 654 | 750 | 484 |
| Extr. | (1,15-5,15) | (24-103) | (350-850) | (415-900) | (315-660) |
| *Récolte 1976 :* | | | | | |
| Darius (*) | 5,15 | 110 | 800 | 810 | 505 |
| Axel | 4,15 | 91 | 775 | 990 | 580 |
| Wattines | 4,15 | 85 | 725 | 830 | 460 |
| Hardi | 3,30 | 82 | 750 | 930 | 440 |
| Lutin | 3,30 | 78 | 650 | 810 | 460 |
| Talent | 3 | 72 | 450 | 790 | 350 |
| Clément | 1,30 | 27 | 300 | 505 | 410 |
| Ensemble $n = 20$ : | | | | | |
| Moy. | 3,30 | 75 | 618 | 831 | 434 |
| Extr. | (1,30-6) | (27-128) | (300-775) | (505-990) | (350-580) |

(*) Enregistreur E 2, 40 g — 400 UB.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *Corrélations (r) :* | | | | | |
| S Mixo. → Vol. pain | 1975 | $n = 36$ | + 0,74** | + 0,73** | + 0,57** |
| | 1976 | $n = 20$ | + 0,76** | + 0,50* | + 0,42 |
| T Mixo. → Vol. pain | 1975 | $n = 36$ | + 0,72** | + 0,64** | + 0,41* |
| | 1976 | $n = 20$ | + 0,74** | + 0,47* | + 0,49* |

Les corrélations associant respectivement les surfaces et les temps de pétrissage du mixographe aux volumes de pains obtenus pour chaque type d'essai, sont significatives à 99 p. 100 (**), dans le cas de l'essai de laboratoire pour les 2 années. Le même niveau de signification s'observe dans le cas de la panification type français pour la récolte 1975, alors que la série 1976 conduit à des corrélations également significatives, mais à un seuil de sécurité de 95 p. 100 (*). Pour ce qui concerne la panification type européen, les résultats de 1975 sont également associés significativement, mais à un degré moindre, aux données du mixographe ($r = + 0,57$**

pour S et + 0,41* pour T), alors que pour 1976 seul le temps de pétrissage se révèle significatif ($r = + 0,41$*).

L'interprétation des mêmes résultats a montré d'autre part que la corrélation associant les volumes de pains de l'essai miniaturisé et de l'essai français était élevée ($r = + 0,80$**) pour les échantillons 1975, également significative mais plus faible ($r = + 0,58$*) pour ceux de 1976. En revanche, il n'est pas apparu de corrélation significative ($r = + 0,28$ à $+ 0,40$) lorsque la comparaison portait sur les données de l'essai européen.

Il convient de remarquer que l'essai type français, conçu pour tester des blés et des farines de caractéristiques proches de celles satisfaisant la meunerie et la boulangerie, s'accomode mal de blés de force plus élevée lorsqu'ils sont panifiés en l'état. La présence, dans l'échantillonnage 1976, de plusieurs lignées « fortes » explique sans doute la corrélation plus faible obtenue entre les 2 méthodes comparativement à 1975.

Quoi qu'il en soit, les résultats du tableau 8 mettent en évidence que les données S et T fournies par le Mixographe sont significativement représentatives du comportement des farines en panification, que celui-ci soit apprécié par un test de laboratoire miniaturisé ou par un essai à plus grande échelle au fournil expérimental, dans le cas d'une panification de type français. Cette signification se révèle plus limitée lorsqu'il s'agit de l'essai type européen.

## Conclusions

Comme en témoignent les références citées dans ce mémoire, le Mixographe a donné lieu depuis plusieurs décennies, et notamment aux U.S.A. où il a vu le jour, à de très nombreux travaux. Dans leur majorité, ceux-ci ont été directement associés au problème de la qualité des blés puisque, dès 1943, certains céréalistes se préoccupèrent déjà de relier les informations des mixogrammes à celles de la panification (Johnson, Swanson, Bayfield) et même de prédire les caractéristiques du pain en fonction de celles du mixographe (Harris, Sibbitt, Scott).

L'originalité de l'étude qui vient d'être exposée repose donc principalement sur le fait qu'elle s'est adressée pour une large part à des blés ou des farines représentatifs de notre production et qu'elle a utilisé un système d'enregistrement particulier, bien qu'inspiré de celui décrit par Voisey, Miller, Kloek en 1966.

Les principales conclusions suivantes peuvent en être dégagées : l'emploi d'un équipement de type Mixographe en vue d'apprécier comparativement les caractéristiques de pétrissage d'échantillons de blés ou de farines rend indispensable d'opérer sur des pâtes de même consistance. Il implique donc une détermination préalable de la capacité d'hydratation propre à chaque farine. Compte tenu de l'influence exercée par certains constituants de la pâte et notamment le sel, toute étude comparative implique également de travailler sur des pâtes de même composition.

Pour des conditions de pétrissage définies et pour des pâtes de composition et de consistance fixées, l'enregistrement des variations du couple montre que le temps de pétrissage au couple maximum est caractéristique d'un échantillon donné et n'est pas sensiblement affecté par la prise d'essai ou le type d'enregistreur utilisé.

En revanche, toutes autres conditions restant égales, la hauteur et la surface au couple maximum sont tributaires du type d'enregistreur et de la prise d'essai. Alors que la hauteur varie dans des limites relativement étroites pour différents

échantillons de même consistance, le temps de pétrissage et la surface accusent des variations importantes qui sont fonction du niveau de force des blés.

Effectuées sur un grand nombre d'échantillons d'origines, de récoltes et de nature différentes, ces observations montrent ainsi que l'utilisation d'un pétrin enregistreur de faible capacité de type Mixographe convient aussi bien à des lignées en cours de sélection qu'à des variétés pures ou qu'à des lots commerciaux de composition variétale indéterminée.

A lui seul, le Mixographe est donc déjà en mesure de fournir simplement et rapidement au sélectionneur comme au producteur, au stockeur et au meunier, des informations précieuses sur le niveau de force des matières premières. Si besoin est, ces informations peuvent être encore précisées en complétant l'opération de pétrissage par celles conduisant à l'essai miniaturisé de cuisson, de réalisation plus longue, mais fournissant de l'échantillon testé une appréciation plus directe et plus concrète.

Complétant et précisant nos précédentes observations (BOURDET, BERRIER, 1975), la présente étude met en effet en évidence que les valeurs T et S des Mixogrammes sont significativement représentatives de l'aptitude des blés à la panification exprimée par le volume des pains obtenus selon cet essai de laboratoire.

Elles le sont également au regard des résultats fournis par l'essai standard de panification type français et, dans une certaine mesure bien qu'à un degré moindre, avec ceux obtenus selon le protocole européen encore à l'étude, réalisés comme le précédent, par un professionnel au fournil expérimental.

Utilisées séparément ou complémentairement, les méthodes miniaturisées de pétrissage et de cuisson semblent ainsi offrir un outil analytique simplifié et un moyen technologiquement significatif pour apprécier l'aptitude des blés à la panification également dénommée parfois « valeur panifiable ».

Leur mise en œuvre devrait permettre de caractériser significativement les différents niveaux de force des blés nécessaires aux diverses industries de cuisson, depuis les blés très faibles jusqu'aux blés forts améliorants en passant par les types directement utilisables par la boulangerie.

Dans le cas particulier que pose actuellement la différenciation entre blés panifiables et blés fourragers, la méthode au Mixographe, éventuellement complétée d'un essai de cuisson miniaturisé, semble pouvoir offrir un outil analytique de meilleure spécificité que le test officiel qui a été retenu.

Contrairement à une conception trop souvent répandue, la miniaturisation des techniques visant à apprécier la qualité des blés, indispensable en sélection précoce du fait des faibles disponibilités en matériel, conserve toute son efficacité au niveau industriel où la matière première n'est pas limitée. Elle permet au contraire un contrôle plus rigoureux des conditions expérimentales, offre des conditions de réalisation plus simples, plus rapides et moins coûteuses, sans déprécier pour autant la signification technologique des résultats obtenus. C'est du moins ce que semble avoir montré l'étude présentée.

*Reçu pour publication en décembre 1978.*

## Remerciements

Nous remercions la D.G.R.S.T. qui a contribué financièrement à la réalisation d'une partie de ce travail. Nos remerciements s'adressent également aux Stations d'Amélioration des Plantes de l'I.N.R.A., à l'I.T.C.F., à l'O.N.I.C. et aux divers organismes de stockage qui nous ont aimablement fourni les différents matériels d'étude. Nous remercions enfin les Grands Moulins de Paris pour la réalisation des essais de panification au fournil expérimental.

## Summary

*The baking value of wheats as appreciated by the mixing behaviour of doughs*

More than 400 wheat samples, representative of the french production, were studied between 1972 and 1976 with two small scale tests: one by recording the variations of the torque during mixing with a Mixograph mixer type, the other for appreciating the bread making value by baking.

Typical mixograms obtained from the same flour with two recording devices are presented and the parameters checked at the maximum torque value are defined: mixing time (T mn) heigh (H cm) and area (S $cm^2$) of mixograms.

The respective effect of hydration rate, nature of solutions used (with or without ClNa) is evidenced and the importance of dough consistency and formula during comparative mixing is emphasized.

When, for constant consistency and composition, H is scarcely modified, T and S show large variations according to the strengh level of wheats; T is characteristic of the wheat type and independent of the recording device, when S, similarly characteristic, varies with the recording system used. The S values obtained with both systems are highly correlated.

Results obtained by mixing and baking on several series of weak, medium and strong wheats are presented with some typical mixograms. It is evidenced that mixograms S and T values are significantly related with bread volumes in small scale baking test. Similar observations are made with the french baking test and, to a less extent, with the « european » one.

The mixograph test, possibly completed with the small scale baking test, seems to offer an interesting possibility for differenciating the bread wheats from the feed wheats.

The interest of small scale methods for baking value determination of wheats, as for breeding so for industrial check tests, is emphasized.


## Références bibliographiques


AUTRAN J. C., BOURDET A., 1975. L'identification des variétés de blé : établissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grain. *Ann. Amélior. Plantes*, **25**, 277-301.

BAIG M. M., HOSENEY R. C., 1977. Effects of mixer speed, dough temperature and water absorption on flour-water mixograms. *Cereal Chem.*, **54**, 605-615.

BARMORE M. A., 1958. Objective tests of quality in wheat and wheat products. *Food Technol.*, **12**, 291-296.

BODE C. E., 1954. Research at the Solft Wheat Quality Laboratory. Part I. *Trans. A.A.C.C.*, **12**, 108-112.

BOURDET A., BERRIER R., 1972. La panification expérimentale au laboratoire et au fournil dans l'appréciation des blés tendres. *C.R. Acad. Agric.*, **58**, 65-74.

BOURDET A., BERRIER R., 1973. Micro essai de cuisson pour différencier les variétés de blé tendre selon leur force. *C. R. Acad. Agric.*, **59**, 59-65.

BOURDET A., BERRIER R., AUTRAN J. C., 1976. Appréciation de la force des blés tendres en sélection précoce. Étude comparée de différents tests miniaturisés. *Ann. Amélior. Plantes*, **26**, 265-277.

C.E.E., 1975 à 1977. Rapports 75.946; 76.314 et 399; 77.336 et 704 du Groupement des Associations Meunières des Pays de la C.E.E. sur la mise au point d'un test de panification européen.

C.E.E., 1976. Méthode de détermination de la qualité panifiable. *Règlement C.E.E.*, n° 1831-76, du 28 juillet.

C.N.E.R.N.A., 1969. (Centre National d'Études et de Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation). Groupe essai de panifiation. Méthode directe pétrissage intensifié.

FINNEY K. F., YAMAZAKI W. T., 1967. Quality of hard, soft and durum wheats dans Wheat and Wheat improvement. Agronomy Monograph n° 13, Chap. 14. *Amer. Soc. Agron.*, Madison (Wisc.).

FINNEY K. F., SHOGREN M. D., 1972. A ten-gram mixograph for determining and predicting functional properties of wheat flours. *Baker's Digest*, **46**, 32-42 et 77.

FINNEY K. F., POMERANZ Y., BOLTE L. C., SHOGREN M. D., 1977. Hochertragreiche europäische Weizensorten : Beurteilung des verarbeitungs wertes. *Getreide Mehl und Brot*, **31**, 57-63.

FINNEY K. F., HEYNE E. G., SHOGREN M. D., BOLTE L. C., POMERANZ Y., 1978. Functional properties of high-yielding european wheats grown at Manhattan Kansas. *6e Congr. Intern. I.C.C.*, Winnipeg (abstr.).

HARRIS R. H. SIBBITT L. D., BANASIK O., 1943. The prediction of loaf volume of hard red spring wheat flours from some properties of mixograms. *Cereal Chem.*, **20**, 211-223.

HARRIS R. H., SIBBITT L. D., SCOTT G. M., 1945. Comparative effects of variety and environment on some properties of North Dakota hard red spring wheat flours. *Cereal Chem.*, **22**, 75-81.

HOSENEY R. C., FINNEY P. L., 1974. Mixing; a contrary wiew. *Baker's Digest*, **48**, 22-28.

JOHNSON J. A., SWANSON C. O., 1942. The testing of wheat quality by recording dough mixer curves obtained from sifted wheat meals. *Cereal Chem.*, **49**, 216-229.

JOHNSON J. A., SWANSON C. O., BAYFIELD E. G., 1943. The correlation of mixograms with baking results. *Cereal Chem.*, **20**, 625-644.

JOHNSON J. A., SWANSON C. O., 1945. Effect of fermentation, rest periods and formula ingredients on mixogram patterns. *Cereal Chem.*, **22**, 204-214.

LAMB C. A., 1944. Sifted wheat meal mixograms for selecting soft wheat varieties. *Cereal Chem.*, **21**, 57-67.

LARMOUR R. K., WORKING E. B., OFELT C. W., 1939. Quality tests on hard red winter wheats. *Cereal Chem.*, **16**, 733-752.

LECLERCQ J. R., 1961. La force boulangère des blés et son appréciation au cours de la sélection. *Ann. Technol. Agric.*, **10**, 257-288.

MORRIS V. H., BODE C. E., HEIZER H. R., 1944. The use of the mixogram in evaluating quality in soft wheat varieties. *Cereal Chem.*, **21**, 49-57.

RUBENTHALER G. L., BRUINSMA B. L., ANDERSON P. D., 1977. *62e Ann. Meeting A.A.C.C.*, San Francisco (Abstr.).

SANCHEZ C. R., HOSENEY R. C., MORITZ G., 1973. Brine versus dry salt in breadmaking. *Baker's Digest*, **47**, 23-25 et 67.

SCHROEDER L. F., HOSENEY R. C., 1976. Mixograph studies II Interactions during dough mixing. *Baker's Digest*, **50**, 44. (Abstr.).

SHELLENBERGER J. A., SHOGREN M., LAUDE H. H., 1958. Microtechnics applied to wheat quality evaluation. *Agron. Journ.*, **50**, 151-153.

SHUEY W. C., 1963. Physical testing and dough properties. *Baker's Digest*, **37**, 61-62, 64-67 et 75.

SHUEY W. C, GILLES A. K., 1966. Effect of spring settings and absorption on mixograms for measuring dough characteristics. *Cereal Chem.*, **43**, 94-103.

SIBBITT L. D., HARRIS R. H., 1945. Comparison between some properties of mixograms from flour and unsifted whole wheat meal. *Cereal Chem.*, **22**, 531-538.

SIBBITT L. D., HARRIS R. H., CONCON T. J., 1953. Some relations between farinogram and mixogram dimensions and baking quality. *Baker's Digest*, **27**, 76-79.

SOLLARS W. F., BARRETT F. F., 1964. Soft wheat flour evaluation at the Western Wheat Quality Laboratory. *Baker's Digest*, **38**, 34-39.

SWANSON C. O., WORKING E. B., 1933. Testing the quality of flour by the recording dough mixer. *Cereal Chem.*, **10**, 1-29.

SWANSON C. O., 1936. Physical tests to determine the quality of wheat varieties. *Cereal Chem.*, **13**, 179-201.

SWANSON C. O., 1939. Variations in dough development curves. *Cereal Chem.*, **16**, 625-643.

SWANSON C. O., 1941. Factors which influence the physical properties of dough III. Effet of protein content and absorption on the pattern of curves made on the recording dough mixer. *Cereal Chem.*, **18**, 615-627

SWANSON C. O., ANDREWS A. C., 1943. Factors which influence the physical properties of dough V. Gluten protein as the main factor affecting the pattern of mixograms. *Cereal Chem.*, **20**, 61-78.

SWANSON C. O., JOHNSON J. A., 1943. Descriptions of mixograms. *Cereal Chem.*, **20**, 39-42.

SWANSON C. O., ANDREWS A. C., 1945. Dough development and mechanical gluten dispersion in relation to amount of mixing and to the flour water ratio. *Cereal Chem.*, **22**, 60-75.

VOISEY P. W., MILLER H., KLOEK M., 1966. An electronic recording dough mixer I The apparatus. II An Experimental evaluation III Additional methods of recording. *Cereal Chem.*, **43**, 408-437.

YAMAZAKI W. T., 1947. Note on a rapid method for estimation of mixogram area. *Cereal Chem.*, **24**, 518-520.

D'une façon générale la viande est consommée après cuisson. Or le processus de chauffage entraîne des modifications profondes des éléments de structure, myofibrilles et tissu conjonctif. Ces modifications sont elles mêmes fonction de la nature des protéines en ce qui concerne le collagène (WINEGARDEN *et al.*, 1972, KOPP, 1971) et de leur état de contraction et de maturation pour les protéines contractiles. Ainsi un état contracté de la musculature peut, toutes choses égales par ailleurs, entraîner un durcissement de la viande après cuisson.

En dehors de la revue bibliographique de HAMM (1965) les études de synthèse concernant l'action de la chaleur sur le tissu musculaire sont rares, bien que l'étude de l'influence de la cuisson sur le déterminisme de la tendreté de la viande soit l'objet de recherches approfondies dans plusieurs laboratoires (BOUTON HARRIS et SHORTOSE, 1976 *a* et *b*; DAVEY et GILBERT, 1974; DAVEY et NIEDERER, 1977).

Cette publication a pour but de rapporter les résultats préliminaires d'une recherche dans laquelle nous visons, par une approche nouvelle, à discerner la part relative des deux groupes de protéines de structure musculaires dans la définition de la tendreté de la viande après cuisson.

## Matériel et méthodes

### *Les animaux expérimentaux*

Quatre vaches âgées de plus de quatre ans et deux taurillons ont été utilisés pour cette expérience. Les muscles *Rectus abdominis* et *Pectoralis profundus* ont été prélevés sur les deux demi carcasses entre 30 et 60 min après l'abattage. Les muscles du côté droit ont été conservés à température ambiante (20 ± 1 °C) pendant 8 h. puis placés à + 6 °C jusqu'au stade 24 h *post mortem* (muscles témoins). Des prélèvements ont été effectués durant les premières heures en vue de l'étude de la contraction thermique. Les muscles du côté gauche sont placés dans la glace fondante immédiatement après leur prélèvement et jusqu'à 24 h *post mortem*. A partir de ce stade tous les échantillons sont conservés à + 6 °C. Les mesures comparatives réalisées à partir de 24 h ont porté sur la contraction au chauffage, la perte de poids et la tendreté après cuisson.

### *Mesure de la contraction thermique*

Des échantillons de muscle *Rectus abdominis* et *Pectoralis profundus* d'une longueur de 3,0 cm et de section voisine de 0,4 $cm^2$ (calculée par pesée et mesure de la densité) sont fixés entre deux crochets et disposés dans le four du contractomètre préalablement décrit (KOPP *et al.*, 1977). Le milieu de chauffage est constitué par de l'huile végétale, la vitesse de chauffage utilisée est de 3 °C /min. La tension développée est enregistrée en fonction de la température de l'échantillon mesurée à l'aide d'un thermocouple placé à son contact. Des études préliminaires ont montré que des tensions sont proportionnelles à la section de l'échantillon; aussi exprimons nous les résultats par la force développée par unité de section (en $N/cm^2$).

Nous avons également, à l'aide du même dispositif, étudié l'effet d'un choc thermique aux trois températures retenues pour le chauffage (45, 55 et 70 °C).

Dans ce cas les échantillons sont fixés dans le dispositif isométrique et plongés dans le four régulé à la température choisie et la force développée est enregistrée en fonction du temps de chauffage. Les valeurs moyennes sont établies à partir de trois échantillons.

### *Étude des myofibrilles*

Les myofibrilles sont préparées par homogénéisation du muscle dans cinq volumes de solution d'oxalate de potassium 0,005 M, imidazole 0,02 M, KCl 0,08 M, pH 7,4. Après deux heures d'extraction à 0 + 2 °C, l'homogénat est centrifugé à 6 000 g pendant 15 min. Le culot est lavé deux fois dans une solution de KCl 0,05 M et repris dans cette solution.

La dénaturation thermique est réalisée par chauffage au bain marie des suspensions de myofibrilles. Le chauffage est suivi d'un refroidissement immédiat de la suspension de myofibrilles dans la glace fondante. Après centrifugation la quantité de protéines libérée dans le surnageant est mesurée par la méthode de Folin. L'analyse des nucléotides libérés par le chauffage est réalisée sur le surnageant déprotéinisé au TCA (*). Après extraction du TCA (*) par l'éther les nucléotides sont fractionnés selon la méthode de HURLBERT *et al.* (1954).

### *Mesures de la tendreté*

Les mesures ont été réalisées au stade 24 h et 96 h sur le muscle *Rectus abdominis* cru et cuit à 45 °C, 55 et 70 °C pendant 30 min dans l'huile, sur les muscles témoins et ceux refroidis rapidement après prélèvement. Nous avons utilisé l'appareil décrit par SALE et TOURAILLE (1973) qui caractérise la tendreté par deux paramètres du cisaillement : la force maximum (Fm) et le travail (W). Douze mesures sont effectuées par échantillon et les valeurs moyennes de Fm et W sont établies pour une section de 1 $cm^2$.

Les échantillons destinés à subir une cuisson sont coupés sous forme de parallélépipèdes rectangles dont la plus grande dimension est parallèle aux fibres; leur poids initial est compris entre 60 et 80 g. Les pertes de poids à la cuisson sont déterminées après refroidissement complet des échantillons (soit en moyenne 1 h après la fin de cuisson) qui sont débarassés de leur exsudat et de l'huile résiduelle avec du papier filtre. Les dimensions des échantillons sont mesurées avant et après cuisson.

## Résultats

### 1. — *Schéma général de l'évolution* post mortem *de la contraction thermique*

Mesurée dans des conditions isométriques, la contraction thermique du muscle varie dans de très larges proportions durant les premières heures après l'abattage. La figure 1 représente l'évolution des tensions développées au cours d'un chauffage progressif ($\Delta\theta = 3$ °C/min) par des échantillons de muscle *Pectoralis profundus* témoin, donc maintenu à 20 °C jusqu'au moment du prélèvement pour la mesure de contraction.

(*) T.C.A. = acide trichloracétique.

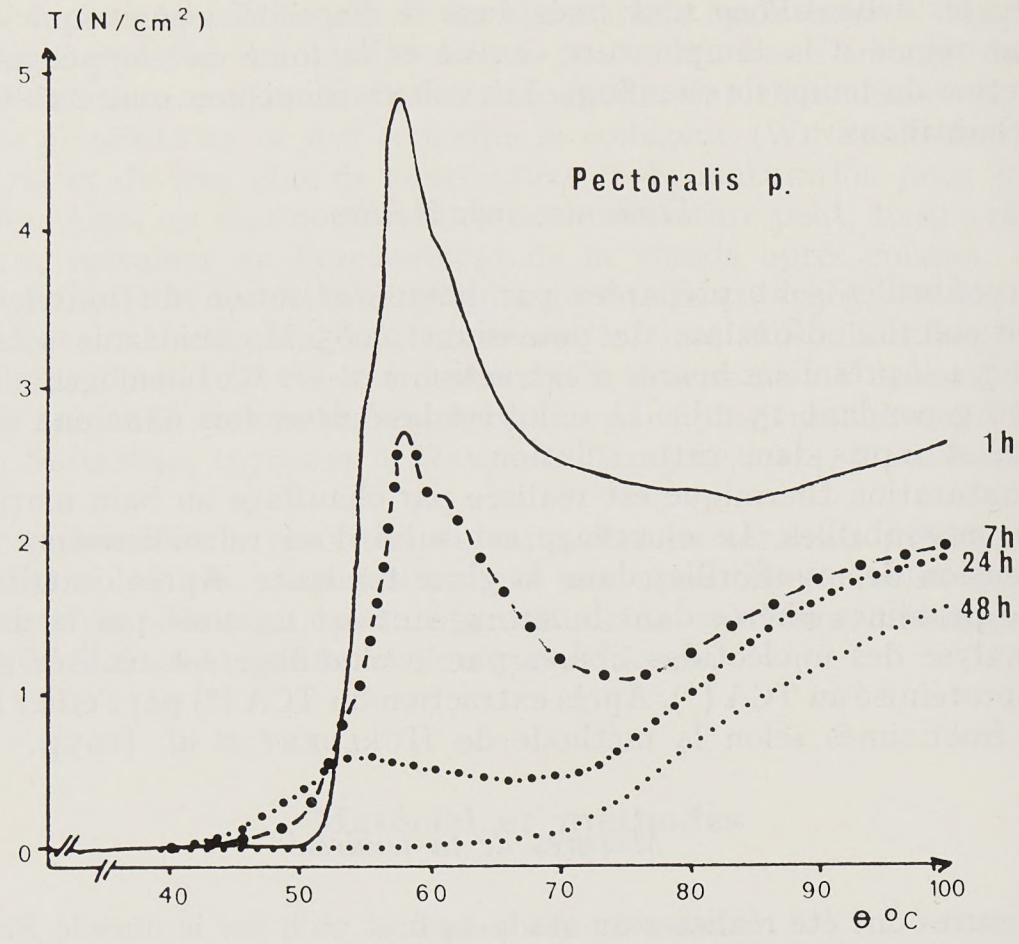



FIG. 1. — *Tensions isométriques développées par le muscle* Pectoralis profundus *au cours du chauffage* ($\Delta\theta = 3$ °C/mn) *pour différents stades* post mortem

Les mesures de pH effectuées sur le muscle (pH mètre à électrode combinée) montrent que la *rigor mortis* est complètement installée au stade 24 h *post mortem*. Lorsque les échantillons sont prélevés sur le muscle pendant ces 24 premières heures, la contraction au chauffage se déroule en 2 étapes. La première débute vers 35-40 °C, les forces mises en jeu se développent rapidement jusqu'à 55-58 °C puis décroissent jusqu'à 75 °C. Il apparaît que l'intensité de cette première contraction diminue rapidement entre 1 h et 30 h *post mortem* (fig 2, courbe 1).

La deuxième contraction se manifeste vers 75 °C durant les premières heures puis lorsque la première contraction disparaît, elle s'installe plus rapidement dès 60 °C à 2 jours *post mortem* (fig. 1). Les tensions enregistrées au cours de cette deuxième phase semblent également varier en fonction du temps *post mortem* (fig. 2, courbe 2), elles sont minimales après 24-48 h, lorsque la *rigor mortis* est installée.

Dans le cas du muscle *Rectus abdominis* nous avons enregistré des résultats comparables, les tensions développées étant cependant plus faibles que pour le muscle *Pectoralis profundus* : 3,50 à 3,80 N/cm² pour le maximum situé à 58 °C et 1,0 à 1,2 N/cm² à 100 °C. Lorsque la température atteint 100 °C dans l'échantillon, l'ébullition de l'eau qu'il contient entraîne une stabilisation de la température et de la tension développée par l'échantillon. Lorsque ce dernier est retiré du four à 100 °C, les pertes moyennes de poids au cours du chauffage sont de l'ordre de 40 p. 100.

Lorsque l'on fait subir aux échantillons non plus un chauffage progressif mais un choc thermique à une température donnée, les tensions développées au cours du chauffage évoluent en fonction du stade *post mortem* du prélèvement (fig. 3). Avant l'installation de la *rigor mortis* une contraction est enregistrée

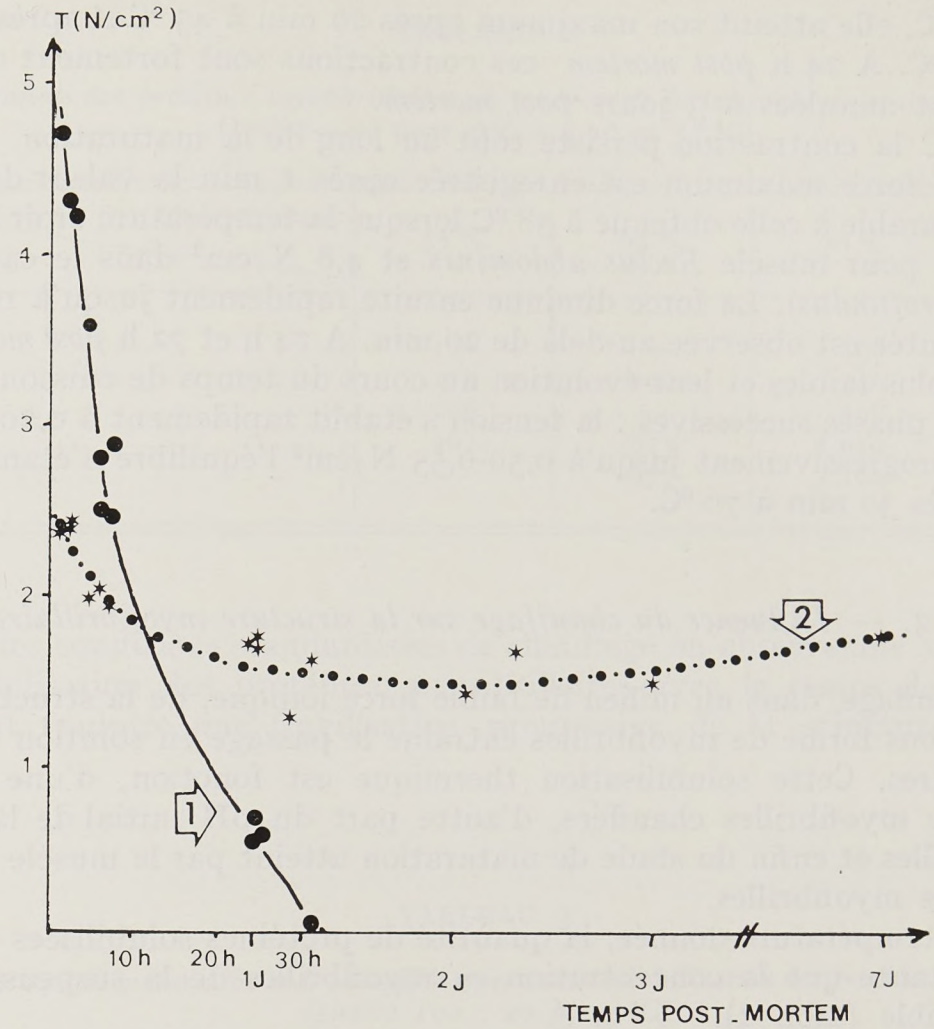



FIG. 2. — *Évolution des tensions isométriques maximales à 58 °C* (1) *et 100 °C* (2) *en fonction du stade* post mortem *pour le muscle* Pectoralis profundus.

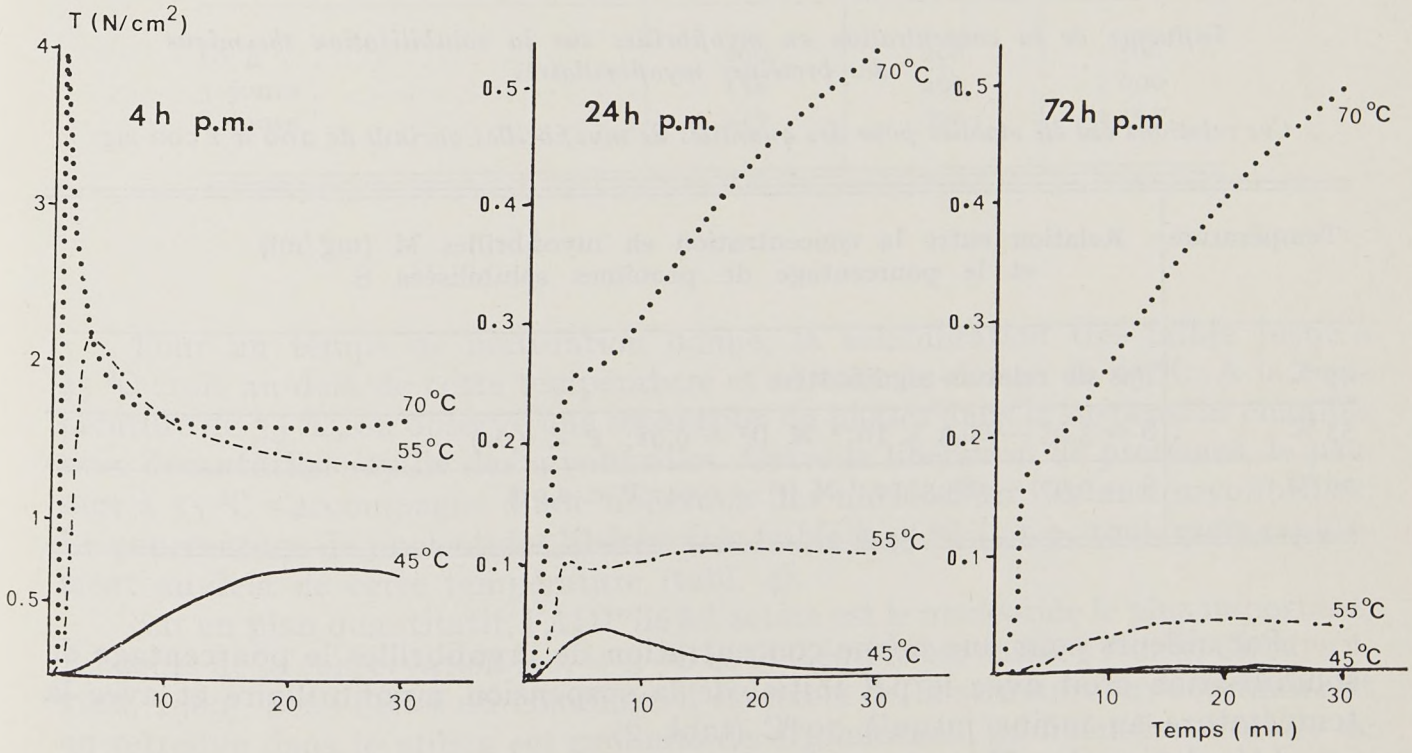



FIG. 3. — *Tensions isométriques développées par le muscle* Rectus abdominis *à température constante* (45, 55 *et* 70 °C) *pour différents stades* post mortem.

à 45 et 55 °C, elle atteint son maximum après 20 min à 45 °C et après 3 min seulement à 55 °C. A 24 h *post mortem* ces contractions sont fortement diminuées et sensiblement annulées à 3 jours *post mortem*.

A 70 °C la contraction persiste tout au long de la maturation. A 24 h *post mortem* une force maximum est enregistrée après 1 min la valeur de cette force étant comparable à celle obtenue à 58 °C lorsque la température croît linéairement (3,8 N/cm² pour muscle *Rectus abdominis* et 4,8 N/cm² dans le cas du muscle *Pectoralis profundus*). La force diminue ensuite rapidement jusqu'à 10 min et une faible remontée est observée au-delà de 20 min. A 24 h et 72 h *post mortem* les tensions sont plus faibles et leur évolution au cours du temps de cuisson met en évidence deux phases successives : la tension s'établit rapidement à 0,20-0,25 N/cm² puis croît progressivement jusqu'à 0,50-0,55 N/cm² l'équilibre n'étant pas encore atteint après 30 min à 70 °C.

### 2. — *Influence du chauffage sur la structure myofibrillaire*

Le chauffage, dans un milieu de faible force ionique, de la structure contractile isolée sous forme de myofibrilles entraîne le passage en solution de protéines myofibrillaires. Cette solubilisation thermique est fonction, d'une part de la quantité de myofibrilles chauffées, d'autre part du pH initial de la suspension de myofibrilles et enfin du stade de maturation atteint par le muscle lors de l'extraction des myofibrilles.

A une température donnée, la quantité de protéines solubilisées est d'autant plus importante que la concentration en myofibrilles de la suspension chauffée est plus faible (tabl. 1).

TABLEAU I

*Influence de la concentration en myofibrilles sur la solubilisation thermique des protéines myofibrillaires*

*Ces relations ont été établies pour des quantités de myofibrilles variant de 200 à 1 000 mg*

| Température | Relation entre la concentration en myofibrilles M (mg/ml) et le pourcentage de protéines solubilisées S |
|---|---|
| 45 °C . . . . | Pas de relation significative |
| 55 °C . . . . | $S = 3{,}65 - 66{,}3 \times 10^{-3}\ M$ ($r^2 = 0{,}91$; $P < 0{,}01$) |
| 70 °C . . . . | $S = 9{,}97 - 183{,}5 . 10^{-3}\ M$ ($r^2 = 0{,}94$; $P < 0{,}01$) |

Par ailleurs pour une même concentration de myofibrilles le pourcentage de solubilisation croît avec le pH initial de la suspension myofibrillaire et avec la température au moins jusqu'à 70 °C (tabl. 2).

L'évolution du pH en cours de chauffage est indépendante de la quantité de myofibrilles chauffées.

TABLEAU 2

*Solubilisation des protéines myofibrillaires en fonction de la température et du pH initial (Indice 100 pour pH = 5,70 et 55 °C)*

| pH initial \ Température | 55 °C | 65 °C | 70 °C | 75 °C |
|---|---|---|---|---|
| 5,70 | 100 | — | 108 | 192 |
| 6,05 | 115 | 296 | 346 | 319 |
| 6,30 | 208 | — | 508 | 470 |
| 6,70 | 262 | 823 | 1 030 | 923 |
| 7,10 | — | 977 | 1 162 | 1 020 |

Dans des conditions standardisées de chauffage on observe une augmentation de la solubilisation des protéines myofibrillaires avec le temps de maturation ce qui peut traduire une fragilisation progressive de la structure contractile (tabl. 3).

TABLEAU 3

*Influence du temps de maturation et de la température sur la solubilisation des protéines myofibrillaires (Indice 100 : 20 h, 45 °C)*

| Temps *post mortem* \ Température | 45 °C | 55 °C | 70 °C |
|---|---|---|---|
| 20 h | 100 | 208 | 560 |
| 3 jours | 158 | 267 | 1 000 |
| 8 jours | 217 | 392 | 1 167 |

Pour un temps de maturation donné, la solubilisation très faible jusqu'à 45 °C croît au-delà de cette température et surtout au-dessus de 55 °C. A la température de 55 °C, on observe une séparation de phases dans la suspension chauffée avec décantation rapide des myofibrilles. Outre la libération de protéines, le passage à 55 °C s'accompagne d'une libération des nucléotides liés aux myofibrilles. Le pourcentage de nucléotides libérés, très faible à 45 °C (5,1 p. 100), croît rapidement au-delà de cette température (tabl. 4).

Sur un plan quantitatif, l'ADP lié à l'actine est le nucléotide le plus important. Au cours de la conservation à 0, +4 °C ce nucléotide est stable (VALIN, CHARPENTIER, 1969). Sous l'effet du chauffage il est exclu de la structure myofibrillaire et on retrouve dans le milieu ses produits de dégradation. La libération brutale de l'ADP vers 55 °C peut traduire un changement profond de la structure des filaments fins dans cette zone de température.

TABLEAU 4

*Analyse des nucléotides et des formes déphosphorylées inclus dans la structure myofibrillaire et relargués au cours du chauffage*
*Les différentes fractions sont exprimées en DO 257 nm par g de tissu*

| | Fraction liée aux myofibrilles à 0 °C + 4 °C | Fractions libérées | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 55 °C | 65 °C | 70 °C |
| AMP | 0,248 | 0,070 | 1,957 | 1,950 |
| GMP | 0,043 | 0,083 | ~ 0 | 0,088 |
| IMP | 0,283 | 1,160 | 0,638 | 1,030 |
| ADP | 4,520 | 0,000 | 0,890 | 1,075 |
| Formes déphosphorylées | 0,260 | 1,360 | 0,730 | 0,795 |
| Σ DO 257/g | 5,354 | 2,673 | 4,215 | 4,938 |
| % relargué | ~ 0 | 50 % | 79 % | 92,2 % |

### 3. — *Influence de la contraction au stade* rigor mortis *sur les propriétés de contraction thermique*

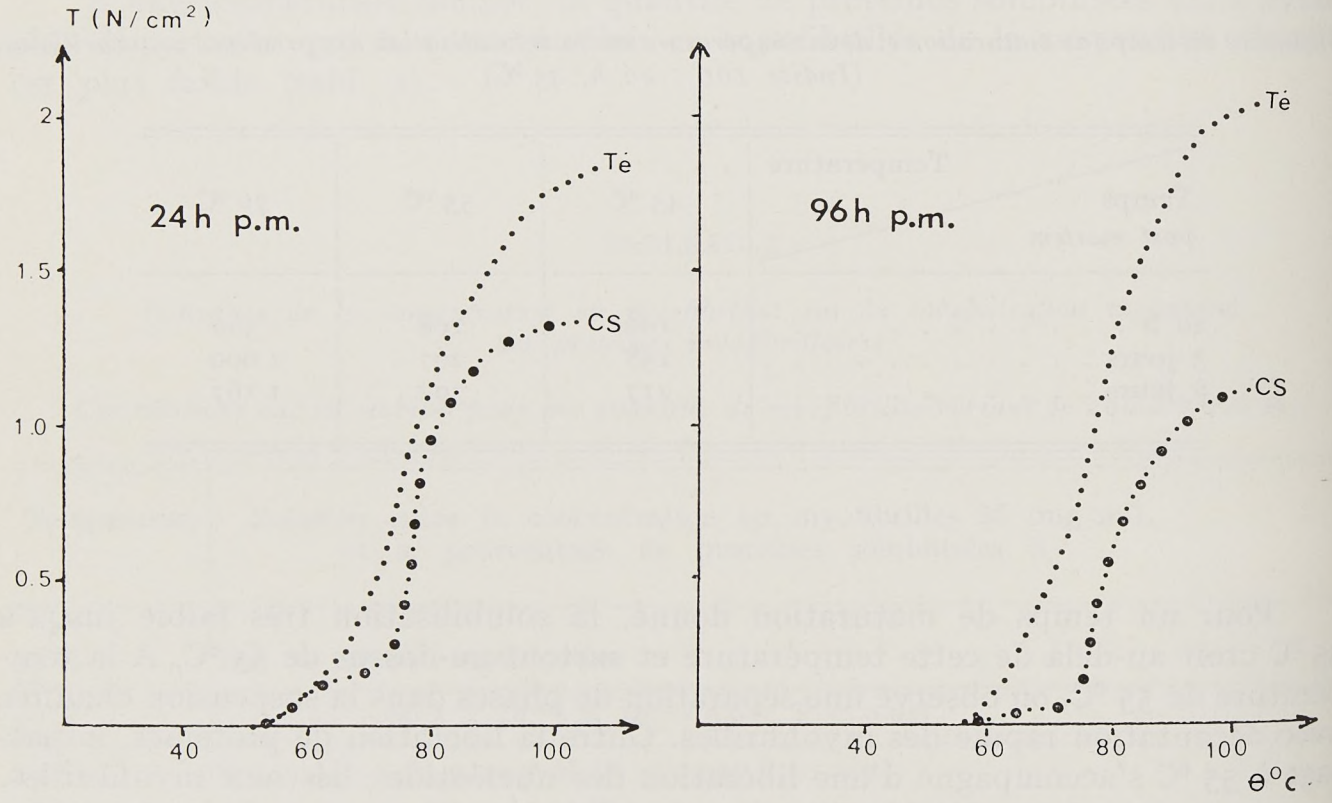



FIG. 4. — *Influence du Cold Shortening sur le déroulement de la contraction isométrique lors du chauffage* ($\Delta\theta = 3$ °C/mn) *pour le muscle* Rectus abdominis.
Té : Témoin.
CS : Cold Shortening.

Les muscles ayant subi le refroidissement rapide après leur prélèvement sur la carcasse présentent au stade 24 h *post mortem* une contraction longitudinale (dans le sens des fibres) importante, de 30 à 40 p. 100, et une contraction dans

le sens perpendiculaire aux fibres dans le plan du muscle d'environ 10 à 15 p. 100, la troisième dimension (épaisseur du muscle) augmentant proportionnellement. La cinétique de contraction au chauffage d'échantillons prélevés sur ces muscles est différente de celle des muscles témoins (fig. 4). Il apparaît que la contraction majeure est fortement retardée et ne se manifeste qu'à 75 °C. L'intensité de la première contraction à 50 °C est comparable dans les muscles *Rectus abdominis* et *Pectoralis profundus*, elle diminue avec le temps de conservation.

La tension développée à 100 °C par les échantillons contractés est toujours significativement inférieure à celle enregistrée pour les témoins et cette différence tend à croître avec le temps de maturation.

Des résultats comparables ont été obtenus par l'analyse de la contraction à température constante. A 70 °C le muscle témoin développe une force maximum de 0,50 à 0,60 N/cm² à 30 min, cette tension n'est que de 0,05 à 0,15 N/cm² dans le cas des muscles contractés.

### 4. — *Influence sur les paramètres du cisaillement*

TABLEAU 5

*Influence de la cuisson sur la tendreté de la viande mesurée par le force de cisaillement (Fm en kg/cm²) dans le cas d'une maturation normale (témoin) ou après Cold Shortening (CS)*

| | 24 h *post mortem* | | | 96 h *post mortem* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Témoin | CS | Δ | Témoin | CS | Δ |
| Frais . . . . . | 2,73 ± 0,54 | 1,63 ± 0,55 | * | 2,28 ± 1,11 | 1,53 ± 0,49 | NS |
| 45 °C . . . . . | 3,05 ± 0,47 | 2,14 ± 0,42 | * | 2,13 ± 1,04 | 2,65 ± 0,65 | NS |
| 55 °C . . . . . | 3,54 ± 0,51 | 2,12 ± 0,78 | * | 3,27 ± 1,02 | 3,18 ± 1,15 | NS |
| 70 °C . . . . . | 3,34 ± 0,89 | 6,39 ± 1,70 | * | 2,79 ± 0,33 | 5,08 ± 0,82 | ** |

Δ : Seuil de signification de la différence Témoin /CS (* $P < 0.025$; ** $P < 0.001$; NS : non significatif).

Le tableau 5 rapporte les résultats des mesures de la tendreté (force maximum de cisaillement (Fm)) pour des muscles ayant subi ou non une réfrigération rapide *ante rigor*. Ces résultats représentent les valeurs moyennes de Fm pour les muscles *Rectus abdominis* des six animaux expérimentaux.

Sur la viande crue le Cold Shortening induit une diminution significative de la force de cisaillement à 24 h *post mortem* ce qui confirme des résultats déjà obtenus sur des animaux plus jeunes dans le cas de muscles congelés *ante rigor* (Kopp, 1973). Cette différence est conservée après une cuisson à 45 ou 55 °C mais la cuisson à 70 °C durcit significativement l'échantillon contracté sans modifier sensiblement la force de cisaillement de l'échantillon témoin. Après 4 jours de maturation seule la différence à 70 °C est conservée.

Le travail de cisaillement évolue sensiblement dans les mêmes proportions et nous enregistrons la même inversion de part et d'autre de la température

de 60 °C qui s'avère être une température critique. La tendreté mesurée par cisaillement ne semble donc être dégradée par le Cold Shortening que pour des températures de cuisson supérieures à 55 °C.

Lors de la cuisson la contraction longitudinale des muscles ayant subi le Cold Shortening est très faible, la contraction des muscles témoins étant de l'ordre de 10 à 15 p. 100 dans le sens des fibres pour le muscle *Rectus abdominis* et 18 à 26 p. 100 pour le muscle *Pectoralis profundus*. Une contraction est également enregistrée dans le sens perpendiculaire aux fibres dans le plan du muscle. Nous n'avons pas noté de différences significatives entre les deux traitements au niveau des pertes de poids à la cuisson. Celles-ci se situent à 1-2 p. 100 à 45 °C, 3-4 p. 100 à 55 °C et 13 à 18 p. 100 à 70 °C.

## Discussion et conclusion

La première contraction apparaissant lors du chauffage de la viande *ante rigor* se produit vers 40-45 °C avec une intensité maximale vers 58 °C. Étant donnée la dimension des échantillons dans nos mesures isométriques (section < 0,5 $cm^2$) l'écart maximum de température entre la surface de l'échantillon où est placé le thermocouple et son centre est de 1,5 à 2 °C. La température où se produit cette contraction intense semble trop élevée pour qu'il puisse s'agir d'un mécanisme classique de contraction musculaire avec glissement relatif des filaments d'actine et de myosine même si l'évolution de cette tension en fonction du temps *post mortem* rappelle la cinétique d'hydrolyse de l'ATP (fig. 2, courbe 1). Cette contraction s'accompagne en effet de modifications importantes de la structure myofibrillaire avec libération de protéines et des nucléotides liés à l'actine ce qui suggère une altération profonde de la structure des filaments fins à ces températures. Par ailleurs Davey et Gilbert (1974) ont mis en évidence des modifications de la solubilité de la myosine et une certaine dénaturation du système contractile entre 40 et 50 °C.

Dans ces conditions la diminution de tension enregistrée au-delà du maximum de contraction de 58 °C en chauffage progressif ou en mesure isothermique (à 70 °C par exemple) pourrait correspondre à une diminution progressive du pouvoir de transmission longitudinale de cette tension par l'édifice myofibrillaire. Mihalyi et Rowe (1966) ont par exemple montré que la strie Z perd pratiquement ses propriétés de liaison à l'actine dès que l'ATP a disparu dans le muscle.

Whiting et Richards (1975) observent également une intense contraction pour les muscles *Psoas major* et *Biceps femoris* de poulet *ante rigor* entre 45 et 55 °C. Les auteurs attribuent cette contraction à une accélération de l'entrée en *rigor* suivie d'une inactivation du système contractile. Il est intéressant de noter qu'en utilisant la méthode de l'analyse thermique différentielle Martens et Vold (1976) et Wright *et al.* (1977) ont mis en évidence une réaction fortement exothermique dont le maximum est situé vers 55-58 °C lorsque le chauffage de la viande est réalisé *ante rigor*. Le pic que Wright *et al.* (1977) attribuent à la dénaturation de la myosine se situe vers 60 °C donc immédiatement après le maximum de contraction et pourrait ainsi expliquer la rapide diminution de tension que nous enregistrons à cette température. Nous avons cependant noté dans tous les cas que la diminution de tension au-delà de 58 °C n'est pas un phénomène simple et en particulier vers 60-61 °C nous observons soit un plateau soit une légère remontée de la tension (fig. 1).

Lorsque la réaction fortement exothermique a disparu, par exemple à 24 h *post mortem*, MARTENS et VOLD (1976) observent une réaction endothermique vers 58 °C qui pourrait correspondre à un changement structural au niveau myofibrillaire se traduisant par un relargage de protéines et de nucléotides liés à l'actine.

Au stade *ante rigor*, toute la contraction enregistrée entre 40 et 60 °C doit être d'origine myofibrillaire. Il est en effet bien admis que dans des conditions isotoniques à un pH voisin de la neutralité le collagène se contracte vers 60-65 °C (MOHR et BENDALL, 1969, KOPP, 1971). A des températures supérieures à 60 °C il peut cependant subsister une part myofibrillaire dans la contraction enregistrée comme c'est le cas à 70 °C dans des conditions isothermiques (fig. 3 à 4 h *post mortem*). Il apparaît que cette contribution myofibrillaire à la contraction au-delà de 60 °C diminue rapidement avec le temps de conservation, il semble donc que la tension que l'édifice contractile est capable de transmettre diminue avec la maturation (de 1,50 à 1,80 N/cm² *ante rigor* à 0,15-0,30 N/cm² *post rigor*). En fin de maturation cette part myofibrillaire dans la contraction totale à 100 °C de l'échantillon (fig. 2, courbe 2) est faible mais non négligeable : les mesures réalisées à une température constante de 70 °C pendant les premières minutes (fig. 3) nous permettent d'évaluer cette tension à 0,20-0,25 N/cm² environ.

Nous avons pu montrer (KOPP, 1977) qu'il existe une étroite corrélation entre la tension isométrique développée à 100 °C par des échantillons de muscle maturés (à 8 j *post mortem*) et la teneur en collagène des muscles et, partant, leur dureté. La tension développée est d'autant plus forte que le muscle est plus riche en collagène. Il s'agit dans ce cas d'une contraction essentiellement collagénique que nous observons déjà à 48 h *post mortem* (fig. 1). A cette contraction sont associés l'expulsion d'eau et l'augmentation de dureté. Nos résultats sont en accord avec ceux de CHRYSTALL (1970) et de DAVEY et GILBERT (1974) qui observent deux phases successives dans le développement de la dureté lors de la cuisson : une phase myofibrillaire entre 40 et 50 °C et une phase collagénique au delà de 65 °C où la contraction des fibres de collagène est l'élément moteur et peut être rendue responsable du durcissement supplémentaire de la viande et en partie de l'expulsion de l'eau.

En fait cette relation entre contraction isométrique, teneur en collagène et tendreté n'est pas un phénomène général, le cas du Cold Shortening nous en fournit un exemple. L'interprétation de l'effet du Cold Shortening sur ces propriétés est délicate. La diminution de la contraction thermique maximale enregistrée dans ce cas peut être due à une diminution de la part myofibrillaire dans cette contraction ou à une modification de la contraction du collagène résultant du raccourcissement du muscle. Nous avons pu observer par ailleurs que l'allongement par étirement des échantillons de muscle augmente proportionnellement la tension maximale. L'état de contraction du système myofibrillaire pourrait ainsi influer sur le degré de tension du réseau conjonctif musculaire.

RHODES et DRANSFIELD (1974) observent un effet similaire de la variation relative de la longueur du muscle sur la tendreté de la viande crue mesurée par cisaillement dans le cas de muscles riches en collagène. Pour un muscle contracté la force de cisaillement est significativement abaissée. Nos résultats sont en accord avec ceux de ces auteurs et montrent en outre qu'un chauffage qui n'affecte que la partie myofibrillaire (de 40 à 55 °C) conserve ces différences. Il semble que la rigidité des échantillons contractés permette un cisaillement progressif des fibres conjonctives au sein même des fibres musculaires rigides, la force maximale étant alors plus faible que pour des muscles « normaux « de consistance plus plastique.

Dans ce dernier cas les faisceaux conjonctifs sont rassemblés par le couteau et sectionnés sur une très faible épaisseur, l'opération mettant ainsi en jeu des forces plus importantes. En fait dans le cas de ces cuissons à une température inférieure à 60 °C un jury de dégustateurs juge les muscles contractés significativement plus durs que les muscles témoins (VALIN, 1973).

Après un chauffage à une température supérieure à 55 °C le durcissement des muscles contractés constaté par des mesures objectives (tabl. 3) ou par un jury de dégustation n'est plus en relation avec les observations faites sur viande crue. Il semble dans ce cas que la cuisson aboutisse à la formation d'un coagulum d'autant plus dense et rigide que le chevauchement des filaments est plus important (BENDALL, 1976).

Pour conclure il apparaît que ce travail nous a permis d'une part de préciser la nature de certaines modifications structurales qui affectent la structure myofibrillaire lorsque la température est voisine de 55 °C, et d'autre part, de mettre en évidence l'influence de l'état de contraction et de maturation du muscle sur l'expression du potentiel de contraction thermique du collagène. Ces résultats soulignent la nécessité d'une approche globale dans toute étude du déterminisme de la tendreté de la viande.

*Reçu pour publication en décembre 1978.*

## Summary

*Thermally induced contraction in bovine muscle as affected by* post mortem *time course*

The aim of this work was the study of the changes in thermal shrinkage properties of muscles during ageing.

When the temperature increases linearly, *ante rigor mortis* samples of bovine muscle put under isometric conditions, develop a large tension at temperature around 55 °C. This tension decreases as *rigor mortis* settles and goes with large changes at the level of the myofibrillar structure: myofibrillar proteins and the ADP associated with action are released. *Post rigor*, even when the isometric tension near 55 °C is no more observed, the biochemical changes still occur and their intensity increases with ageing time.

For temperature above 65 °C, most of the isometric contraction strength depends on the connective tissue proteins but the effect of the myofibrillar proteins upon it is not negligible. This estimated myofibrillar strength decreases from 1.5 — 1.8 N/cm² *ante rigor mortis* to 0.2 — 0.3 N/cm² after an eight days ageing period.

If as shown elsewhere a close correlation exists between isometric contraction strength and connective tissue amount in the muscle, it appears that the contraction state of the myofibrillar structure during the *rigor* process affects the expression of the thermal contractile properties of the connective tissue.

## Références bibliographiques

BENDALL J. R., 1976. Some thoughts on the toughness of Meat. Lecture given to members of the Yugoslavian Institute of Meat Technology. Belgrade, Nov. 1976.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1976*a*. Dimensional Changes in Meat during Cooking. *J. Texture Studies*, **7**, 179-192.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1976*b*. Thermal contraction of Meat during cooking and its possible Influence on Tenderness. *J. Texture Studies*, **7**, 193-203.

CHRYSTALL B. B., 1970. Macroscopic, Microscopic and Physicochemical Studies of the Influence of Heating on Muscle Tissues and Proteins. Ph. D. Thesis. University of Missouri,

DAVEY C. L., GILBERT K. V., 1974. Temperature-dependent Cooking Toughness in Beef. *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 931-938.

DAVEY C. L., NIEDERER A. F., 1977. Cooking Tenderizing in Beef. *Meat Science*, **1** (4), 271-276.

GOLL D. E., ARAKAWA N., STROMER M. M., BUSCH W. A., ROBSON R. M., 1970. In the Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food (2nd Ed). Ed. by E. J. Briskey, R. G. Cassens, B. B. Marsh. University of Wisconsin Press Madison, p. 755-800.

HAMM R., 1965. In the Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food (1st Ed) University of Wisconsin Press Madison. p. 363-385.

HURLBERT R. B., SCHMIRTZ H., BRUMM A. F., POTTER R., 1954. Chromatographic Separation of Acid Soluble Nucleotids. *J. of Biol. Chem.*, **209**, 23-39.

KOPP J., 1971. Evolution qualitative du collagène musculaire de bovin en fonction de l'âge des animaux. Conséquences sur la tendreté de la viande. *Bull. Techn. C.R.Z.V.-IN.R.A.*, **5**, 47-55.

KOPP J., 1973. Influence d'un cycle congélation-décongélation à différents stades de maturation sur la tendreté de la viande de bovin mesurée par cisaillement. XIXth European Meeting of Meat Research Workers. Paris, 2-7 sept. 1973, 581-593.

KOPP J., 1977. Facteurs de variation de la contraction thermique de la viande liés au collagène. XXIIIrd European Meeting of Meat Research Workers, Moscou 4-9 sept. 1977, 410 (1-15).

KOPP J., SALÉ P., BONNET Y., 1977. Contractomètre pour l'étude des propriétés physiques des fibres conjonctives : tension isométrique, degré de réticulation, relaxation. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **10** (1), 69-72.

MARTENS H., VOLD E., 1976. DSC Studies of Muscle Protein Denaturation. XXIInd European Meeting of Meat Research Workers. Malmo, 30 VIII - 3 IX 1976. J9 : 3 — 6.

MIHALYI E., ROWE A. J., 1966. Studies on the Extraction of Actomyosin from Rabbit Muscle. *Biochem Z*, **345**, 267-295

MOHR V., BENDALL J. R., 1969. Constitution and Physical Chemical Properties of Intramuscular Connective Tissue. *Nature*, **223**, 404-405.

RHODES D. N., DRANSFIELD E., 1974. Mechanical Strength of Raw Beef from Cold-shortened Muscles. *J. Sci. Fd Agric.*, **25**, 1163-1164.

SALÉ P., TOURAILLE Ch., 1973. Influence de l'épaisseur initiale de l'échantillon sur les grandeurs caractéristiques du cisaillement des viandes. XIXth European Meeting of Meat Research Workers. Paris, 2-7 Sept. 1973, 627-644.

VALIN C., 1973. La conservation de la viande bovine réfrigérée : transformations biochimiques du muscle et qualité de la viande XXIIIrd European Meeting of Meat Research Workers Paris, 2-7 sept., 155-180.

VALIN C., CHARPENTIER J., 1969. Catabolisme post mortem des nucléotides acido solubles libres et liés du muscle de bovin. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **9**, 555-562.

WHITING R. C., RICHARDS J. F., 1975. Thermally Induced Isometric Tension and Shortening of Pre and Post rigor Chicken Muscle. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **8** (3), 168-169.

WINEGARDEN M. W., LOWE B., KASTELIC J., KLINE E. A., PLAGGE A. R., SHEARER P. S., 1952. Physical Changes and Connective Tissues of Beef during Heating. *Food Research.*, **17**, (2), 172-184.

WRIGHT D. J., LEACH I. B., WILDING P., 1977. Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. *J. Sci. Fd Agric.*, **28**, 557-564.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (1), 121-149.

# Mise au point :

# Polyosides des baies de raisins

J. MOURGUES

*Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I.N.R.A.,*
*Centre de Recherches de Toulouse,*
*11104 Narbonne Cedex*

## Résumé

Cette mise au point concerne les méthodes d'extraction, d'identification et de dosage des différents polyosides du raisin (substances pectiques et autres polymères hydrosolubles, hémicelluloses, cellulose), l'évolution de ces composés pendant la maturation, leur teneur dans les baies à maturité, leur répartition dans les différentes parties (pulpe, pellicule, pépins), l'influence des conditions de culture et des attaques de pourriture grise, les modifications au cours de la conservation des raisins de table.

Mots clés : *polyosides, raisin, maturation, conservation, monographie.*

## I. — Introduction

On attribue généralement aux polyosides et plus particulièrement aux substances pectiques un rôle dans le ramollissement des fruits au cours de la maturation ainsi que dans leur aptitude à la conservation.

Dans le cas du raisin dont la plus grande partie est transformée en vin, une fraction des polyosides se retrouve en suspension et en solution dans les moûts et les vins. Ces corps interviennent dans la stabilité physico-chimique et microbienne des vins, la filtrabilité, les propriétés gustatives.

Aucune mise au point bibliographique française n'a été faite sur ce sujet. Celles provenant d'Italie (Usseglio-Tomasset, 1976) ou d'U.R.S.S. (Datounashvili, 1973 ; Mekhuzla, 1977) ne concernent que les travaux effectués dans ces pays ou les pays limitrophes; en outre, elles portent surtout sur les moûts et les vins.

Ce travail sera consacré uniquement aux polyosides du raisin; nous passerons ultérieurement en revue les modifications de ces composés au cours des transformations technologiques.

Nous définirons dans un premier temps ce que l'on entend par polyosides, leur localisation, les principales méthodes d'extraction d'identification et de dosage même s'il n'est pas possible de lever tout à fait l'ambiguïté associée surtout à leur classification et à leur détermination. Nous indiquerons ensuite l'évolution de ces constituants au cours de la maturation, la composition des baies à maturité et de leurs différentes parties, l'influence des conditions de culture et des maladies, l'évolution des polyosides pendant la conservation des raisins de table.

## II. — Définitions des polyosides, leur localisation

Les polyosides sont des macromolécules, de haut poids moléculaire, polymères des oses; ils sont classés en homopolyosides et en hétéropolyosides selon qu'ils renferment un seul ou plusieurs types d'oses (Aspinall, 1970).

Les composés pectiques font partie des hétéropolyosides; ils comprennent les protopectines, les acides pectiniques, les pectines, les acides pectiques.

Cette classification utilisée bien avant 1949 (Dorée, 1949) a été adoptée il y a 25 ans par l'« American Chemical Society » (Kertesz, 1951; Pilnick et Voragen, 1970) et l'Union Soviétique depuis 1949 (Nilov et Skourikhin, 1964; Kischkovsky et Skourikhin, 1976).

Le terme de protopectine s'applique aux substances pectiques insolubles dans l'eau et produisant après hydrolyse des acides pectiniques; leur structure moléculaire n'est pas encore tout à fait élucidée.

Les acides pectiniques sont constitués par l'enchaînement d'au moins deux cents molécules d'acide D galacturonique attachées l'une à l'autre par des liaisons osidiques $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4. Des unités L. rhamnose sont réparties par groupe à intervalle régulier tout au long des chaînes polygalacturoniques (Meurens, 1978).

Les pectines désignent les acides pectiniques hydrosolubles plus ou moins riches en méthoxyle et plus ou moins neutralisés, capables de former des gels en présence de sucre et d'acide.

Les acides pectiques sont constitués par des acides polygalacturoniques colloïdaux non estérifiés par le méthanol contenant une centaine de molécules d'acide D galacturonique.

A l'extraction, les substances pectiques sont plus ou moins hétérogènes; souvent des arabanes et des galactanes restent soudées par covalence aux chaînes pectiques proprement dites.

Dans le cas du raisin, les auteurs soviétiques désignent l'ensemble des composés pectiques par le terme polyosides acides conformément à la classification de Linevitch (1965), les autres polymères glucidiques par le terme polyosides neutres.

Les réseaux complexes de chaînes polygalacturoniques sont associés entre eux et aux constituants végétaux qui les accompagnent (hémicelluloses, cellulose) par des liaisons primaires telles que les liaisons ioniques du $Ca^{++}$ entre deux carboxyles et par des liaisons secondaires telles que les liaisons par pont hydrogène des groupements OH (Pilnik et Voragen, 1976). Les hémicelluloses, ainsi appelées parce qu'elles accompagnent toujours la cellulose, peuvent être définies comme les polyosides extraits par des solutions alcalines sur des résidus de plantes traitées

par l'eau froide et chaude. Actuellement ces substances sont isolées après avoir éliminé la lignine et les pectines (Isherwood, 1970). Leur hydrolyse acide libère des pentoses, des hexoses et des acides uroniques.

La cellulose un polymère du cellobiose (β glucosido 4 glucose), est déterminée par hydrolyse dans l'acide sulfurique à 72 p. 100 après élimination des composés pectiques et des hémicelluloses.

Au point de vue localisation, les substances pectiques sont surtout abondantes dans les parois primaires des cellules et dans les lamelles mitoyennes qui les séparent, les hémicelluloses et la cellulose dans les parois primaires et secondaires des membranes cellulaires.

Dans la baie de raisin à maturité, il n'y a pas d'autres polyosides en quantité importante. Swift, Buttrose et Possingham (1973) ont signalé la présence de granules d'amidon dans les cellules des ovaires des inflorescences. Après fécondation, ces granules disparaissent progressivement; à maturité, on ne les retrouve que dans l'épiderme et dans quelques couches cellulaires subépidermiques.

## III. — Méthodes d'extraction, d'identification et de dosage

### A. — *Préparation des parois cellulaires des baies*

Depuis Muntz et Lainè (1906), la plupart des auteurs opèrent sur des baies épépinées; en effet, les pépins se retrouvent presque intacts après la vinification et ne cèdent pas au vin des polyosides comme les autres parties de la baie (pulpe, pellicule).

Parfois le moût est séparé des baies par pressurage (fig. 2); nous ne mentionnerons dans cette mise au point que les travaux mettant en parallèle la composition des moûts et des parties solides des baies.

Le broyage et l'extraction dans l'éthanol chaud à 80 p. 100 suivi d'un séchage est la méthode la plus utilisée pour la préparation des parois cellulaires. Ce procédé élimine les oses simples et autres composés à faible masse moléculaire. Tarantola et Usseglio-Tomasset (1963 *a*), Datounashvili et Ezhov (1973) opèrent un broyage dans l'acétone.

### B. — *Extraction à partir des parois cellulaires*

Les figures 1 et 2 indiquent les schémas de fractionnement utilisés pour traiter les parois cellulaires de pellicules et de baies épépinées.

Les pectines solubles sont extraites par l'eau chaude ou bien successivement par l'eau froide et chaude.

La protopectine 1 est solubilisée par le citrate d'ammonium, la protopectine 2 par le sel disodique de l'E.D.T.A. après extraction alcaline des hémicelluloses. La lignine est éliminée par l'hypochlorite (fig. 1) ou bien constitue le résidu de l'hydrolyse de la cellulose (fig. 2).

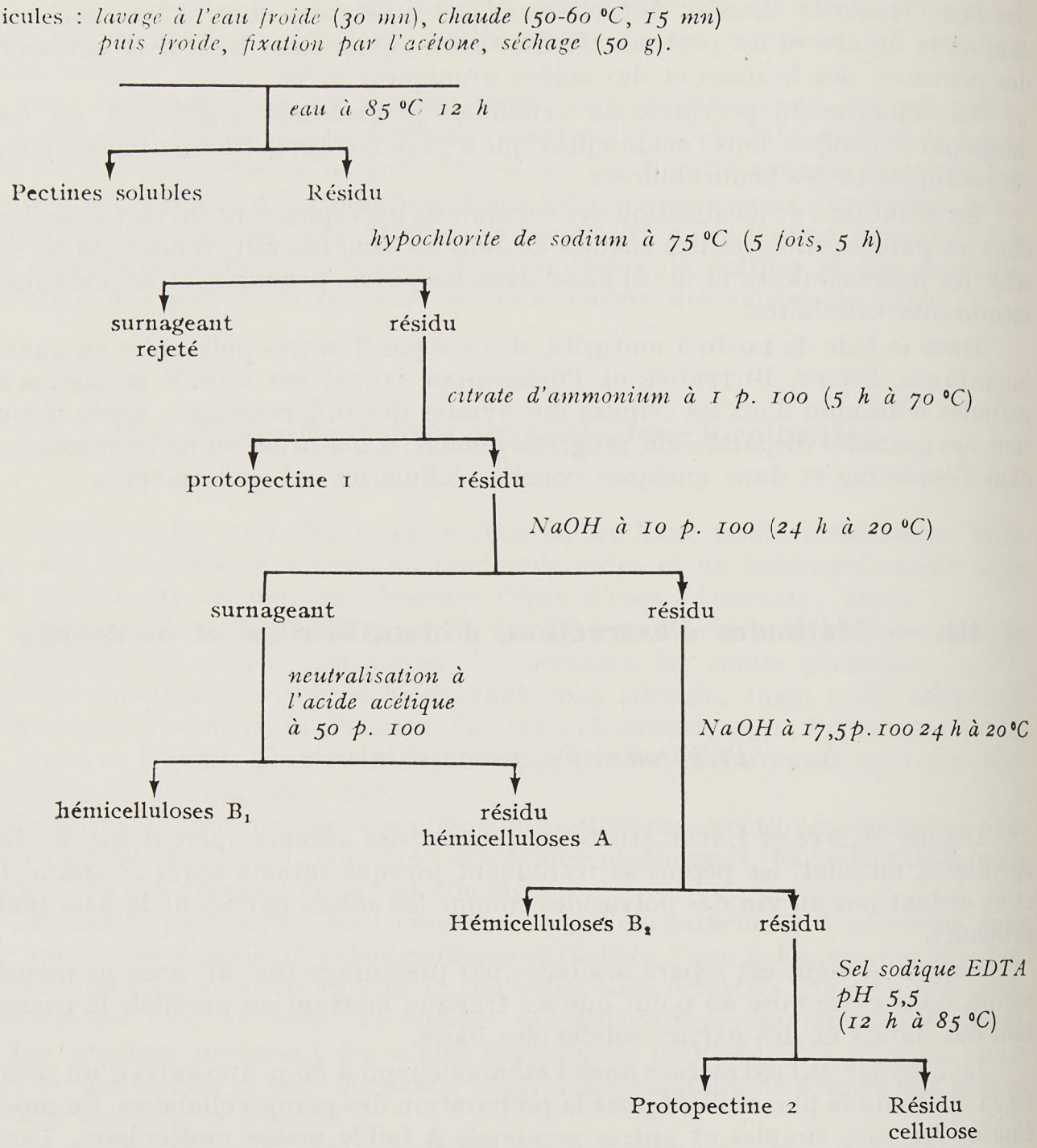



FIG. 1. — *Schéma de fractionnement des polyosides des pellicules* selon EZHOV et DATOUNASHVILI (1974). *En dehors des hémicelluloses A, tous les polyosides sont isolés par précipitation dans l'éthanol à 80°GL.*

### C. — *Isolement des polyosides dans les extraits aqueux des parois cellulaires de baies et dans les moûts*

La précipitation par l'alcool la plus utilisée a été surtout étudiée pour les moûts et les vins. SEMICHON et FLANZY (1927) ont remplacé la dialyse utilisée par MUNTZ et LAINÉ (1906) pour éliminer les matières minérales du précipité colloïdal par une acidification du milieu avec de l'acide chlorhydrique. Cette méthode a été reprise par PEYNAUD (1952) et utilisée par USSEGLIO-TOMASSET (1976), SALGUES (1977), DUBOURDIEU (1978); on précipite l'ensemble des colloïdes des moûts et des vins centrifugés et acidifiés en amenant le milieu à 80 °GL (addition de 5 volumes

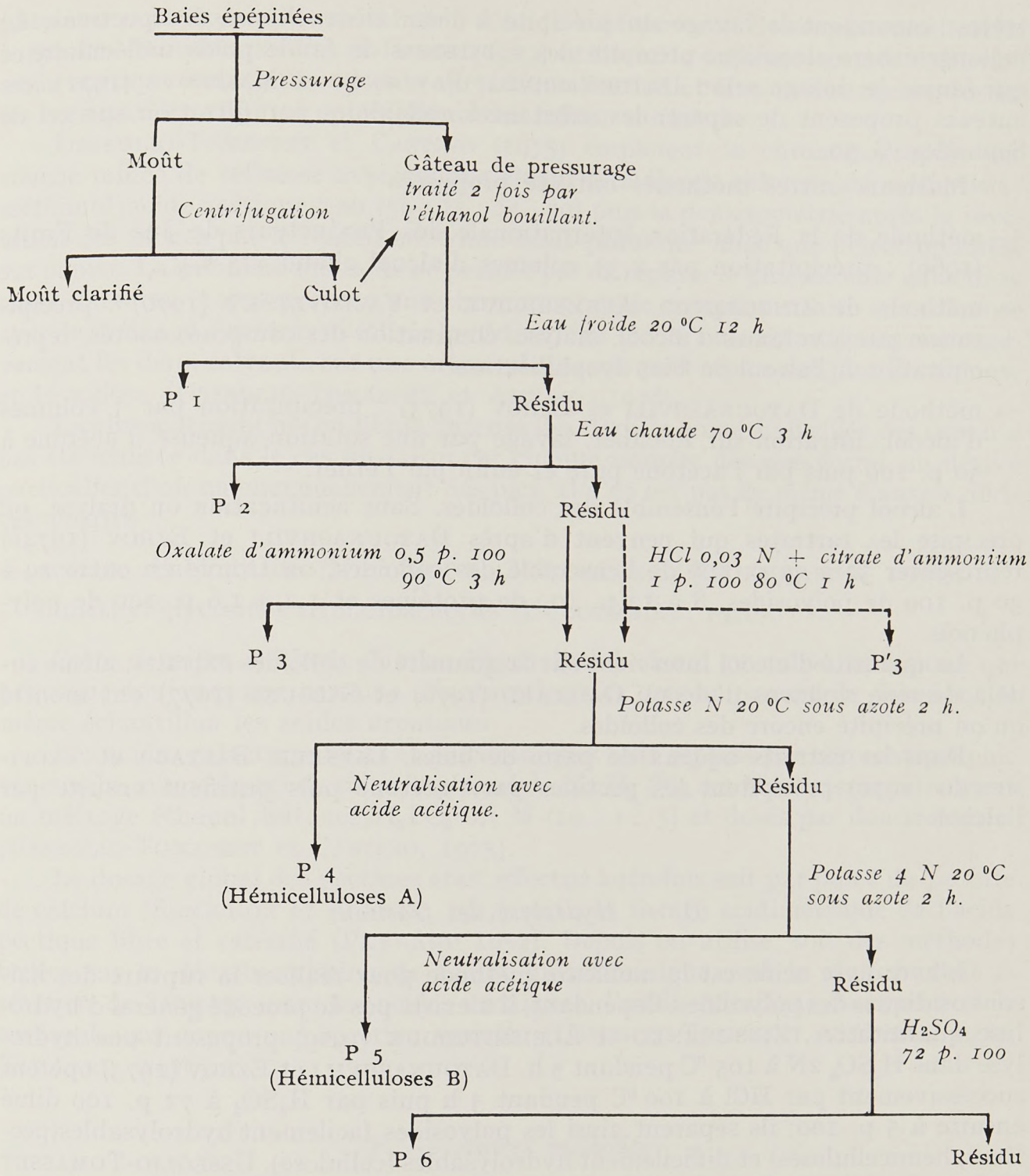



FIG. 2. — *Schéma de fractionnement des polyosides des baies* selon ZINTCHENKO, GRAMATSKAYA et KESHISHEVA (1975).

d'alcool à 96 °GL). Après plusieurs jours de repos à la température ambiante, décantation, centrifugation, lavage à l'eau tiède suivi d'une nouvelle centrifugation pour éliminer les substances polyphénoliques polymérisées, on précipite à nouveau en ramenant le milieu à 80 °GL. Le culot de centrifugation lavé à l'alcool absolu est séché sous vide.

NETCHAEV (1947) n'acidifie pas le milieu car cette opération est préjudiciable aux colloïdes; il les précipite par un mélange éthéro-alcoolique tout comme MARSH et BONEVA (1952) dont la méthode simplifiée a été utilisée par DEIBNER, RIFAI et FLANZY (1958). NAZAROVA (1957) a proposé une méthode qui élimine les tar-

trates; cependant le lavage du précipité à l'eau tiède élimine les pectines. Le mélange éthéro-alcoolique précipite des substances de faible poids moléculaire ce qui fausse le dosage selon DATOUNASHVILI, PAVLENKO et MALIKOVA (1971); ces auteurs proposent de séparer les substances colloïdales par filtration sur gel de Sephadex G 50.

Plusieurs autres méthodes ont été proposées :

— méthode de la Fédération Internationale des Producteurs de Jus de Fruits (1966) : précipitation par 2,33 volumes d'alcool chaud (75 °C);

— méthode de ZINTCHENKO, ALEKSEICHUK et YAZLOVETSKY (1970) : précipitation par 4 volumes d'alcool, dialyse, élimination des composés azotés, reprécipitation à l'alcool ou bien lyophilisation;

— méthode de DATOUNASHVILI et EZHOV (1973) : précipitation par 3 volumes d'alcool, filtration sur Buchner, lavage par une solution aqueuse d'acétone à 50 p. 100 puis par l'acétone pure et enfin par l'éther.

L'alcool précipite l'ensemble des colloïdes. Sans acidification ou dialyse, on précipite les tartrates qui peuvent d'après DATOUNASHVILI et EZHOV (1974*b*) représenter 32 à 37 p. 100 de l'ensemble des colloïdes; on trouve en outre 29 à 30 p. 100 de polyosides, 8 à 13 p. 100 de protéines et 1,2 à 1,6 p. 100 de polyphénols.

La quantité d'alcool intervient sur la quantité de colloïdes extraits; même au-delà de cinq volumes d'alcool, GAILLARD (1976) et SALGUES (1977) ont montré qu'on précipite encore des colloïdes.

Dans les extraits aqueux de paroi de baies, LAPSKER, BALTAGA et TROFIMENKO (1970) précipitent les pectines par l'acétone puis purifient ensuite par l'alcool.

### D. — *Hydrolyse des fractions*

L'hydrolyse acide est la meilleure méthode pour réaliser la rupture des liaisons osidiques des polyosides. Cependant, il n'existe pas de procédé général d'hydrolyse quantitative. ZINTCHENKO et ALEISEITCHOUK (1969) proposent une hydrolyse dans $H_2SO_4$ 2N à 105 °C pendant 5 h. DATOUNASHVILI et EZHOV (1973) opèrent successivement par HCl à 100 °C pendant 3 h puis par $H_2SO_4$ à 72 p. 100 dilué ensuite à 5 p. 100; ils séparent ainsi les polyosides facilement hydrolysables (pectines, hémicelluloses) et difficilement hydrolysables (cellulose). USSEGLIO-TOMASSET et CASTINO (1975) ont recherché les conditions optimales d'hydrolyse en opérant en ampoule fermée, à 100 °C dans $H_2SO_4$ N. Il n'y a pas de perte sensible en hexoses et pentoses au delà de 4 h; par contre il y a destruction de 22 p. 100 de l'acide galacturonique et 37 p. 100 de l'acide glucuronique.

### E. — *Identification et dosage des oses et des acides uroniques*

Pour les oses, ZINTCHENKO et GRAMATSKAYA (1971) utilisent la chromatographie descendante sur papier dans l'un des trois solvants : n butanol/pyridine/eau (6 : 4 : 3), n butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) et acide fornique/méthyléthylcétone/butanol III/eau (15 : 30 : 40 : 25); les oses révélés par l'anisidine

phtalate, puis élués par une solution d'acide acétique sont dosés par colorimétrie à 450 nm. DATOUNASHVILI et EZHOV (1973) utilisent le mélange acétate d'éthyle / acide acétique /eau (3 : 1 : 3) puis après identification et élution des taches dosent les oses par l'α naphtol ou le phénol en milieu sulfurique.

USSEGLIO-TOMASSET et CASTINO (1975) emploient la chromatographie sur couche mince de cellulose avec comme éluant le mélange chlorure de méthylène / méthanol /acide acétique /eau (50 : 15 : 25 : 10) puis la densitométrie après la révélation des taches par le réactif anisidine-acide phtalique ainsi que l'électrophorèse sur papier. La première méthode ne permet pas de séparer le glucose et le galactose; aussi SALGUES (1977) propose une chromatographie complémentaire sur cellulose avec le mélange : acétate d'éthyle /pyridine /eau (2 : 1 : 2). En utilisant successivement les deux solvants sur une même plaque, on peut séparer en plus l'arabinose et le xylose (USSEGLIO-TOMASSET et AMERIO, 1978).

La chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsylilés des oses n'a pas été utilisée dans le cas du raisin car chaque isomère des oses forme un dérivé particulier d'où un chevauchement des pics. Il n'en est pas de même d'autres dérivés volatils :

— acétate d'aldonitrile (MINTCHOUK, ZINTCHENKO, KROKHMALUK, 1975);

— o-méthyl-glycosides trifluoroacétylés (DUBOURDIEU, 1978).

Cette dernière méthode élimine l'hydrolyse à chaud en milieu sulfurique qui provoque toujours une certaine dénaturation des oses et permet de doser sur le même échantillon les acides uroniques.

Les acides galacturoniques et glucuroniques sont séparés par chromatographie sur couche mince de gel de silice imprégné de $Na\ H_2\ PO_4$ 0,2 M avec comme solvant un mélange éthanol /butanol /$H_3PO_4$ 0,1 M (10 : 1 : 5) et dosés par densitométrie (USSEGLIO-TOMASSET et CASTINO, 1975).

Le dosage global des pectines était effectué autrefois soit par pesée du pectate de calcium (SEMICHON et FLANZY, 1927) soit par titrage acidimétrique de l'acide pectique libre et estérifié (PEYNAUD 1952). Depuis on utilise, soit des méthodes basées sur la décarboxylation de l'acide galacturonique, soit le plus souvent la réaction de DISCHE entre les acides uroniques, l'acide sulfurique concentré et le carbazole qui donne une réaction violette (USSEGLIO-TOMASSET et GABRI, 1975; GAILLARD, 1976).

### F. — *Autres méthodes*

Les méthodes de séparation et de détermination de la structure des polyosides (chromatographie d'échange d'ions sur D.E.A.E. cellulose, perméation sur gel de séphadex, oxydation périodique...) seront mentionnées ultérieurement.

## IV. — Modifications des polyosides au cours de la maturation des raisins

Ce sont surtout les substances pectiques qui ont été les mieux étudiées.

HOPKINS et GOURLEY (1930) constatent une diminution des pectines totales et une augmentation des pectines solubles dans les baies du cépage *Concord*.

Toujours sur ce même cépage, CARTER (1968) signale que les pectines totales des pellicules diminuent au cours de la maturation parallèlement à celles des baies épépinées; rapportée à la matière sèche, la teneur en pectines totales est plus élevée dans les pellicules que dans l'ensemble des baies. La composition des substances pectiques est relativement constante : acide galacturonique (17 à 22 p. 100) degré d'estérification (60-70 p. 100), groupements acétyl (1 p. 100).

D'après GAIVORONSKAYA (1970) la protopectine, en quantité importante dans les baies vertes de dix raisins de table, diminue ensuite au cours de la maturation.

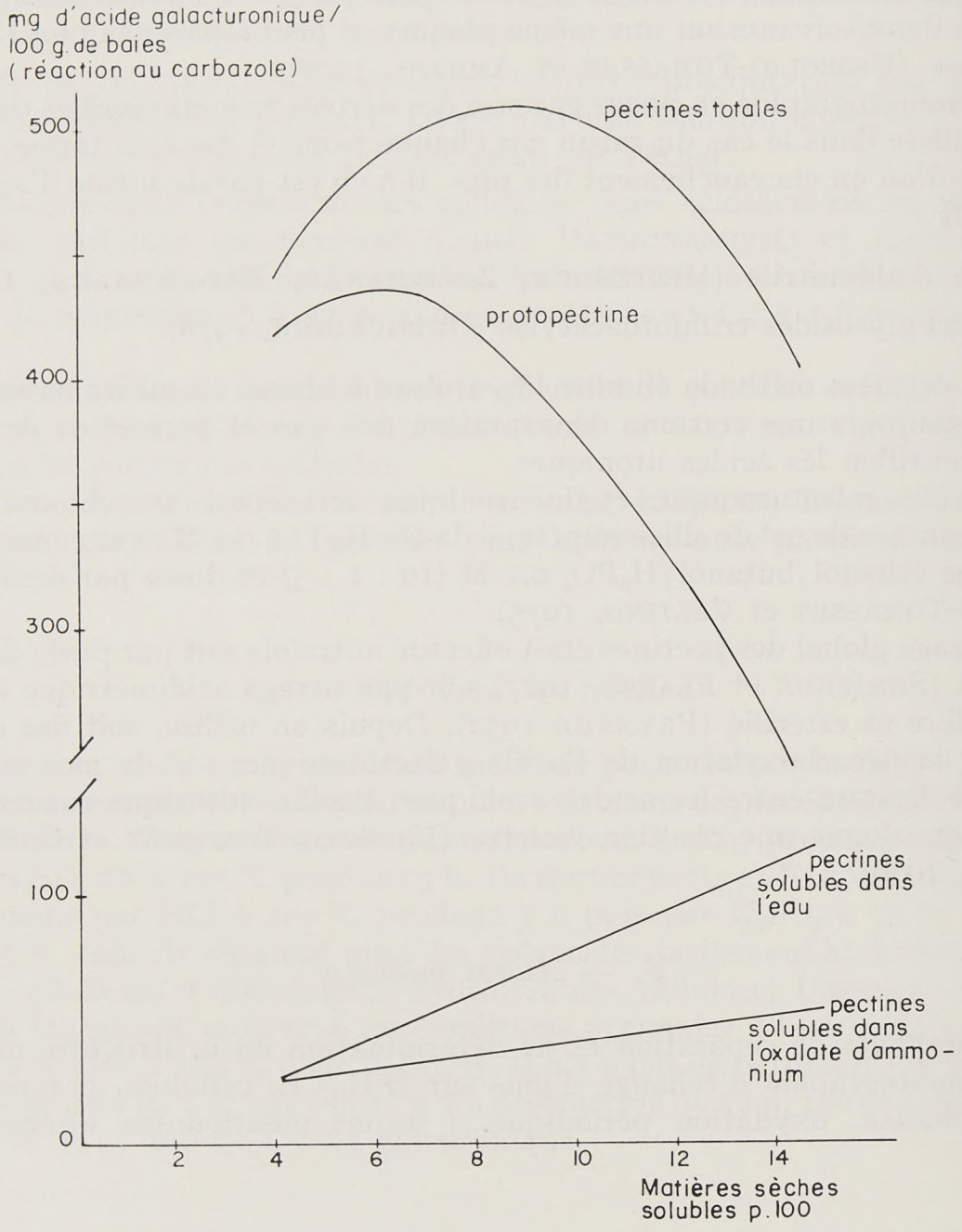



FIG. 3. — *Évolution des différentes fractions des pectines au cours de la maturation des baies du cépage Concord* d'après SMIT et COUVILLON (1971).
Extraction à partir de 10 g de résidu insoluble dans l'alcool.
Pectines totales : 150 ml d'EDTA à 0,75 p. 100 ajusté à pH 11,5 avec Na OH N, agitation 30 mn, addition d'acide acétique N jusqu'à pH 5 et d'enzyme pectolytique.
Pectines solubles dans l'eau : 150 ml d'eau distillée, agitation 1 h, filtration, saponification.
Pectines solubles dans l'oxalate d'ammonium : 150 ml de solution à 0,75 p. 100, agitation 1 h, filtration, saponification.

Smit et Couvillon (1971) ont repris sur le *Concord* l'évolution des différentes fractions de pectines. D'après la figure 3, les substances pectiques totales et la protopectine augmentent jusqu'à un taux de matière sèche des moûts déterminé par réfractométrie de 7 à 9 p. 100, puis diminuent. Les pectines solubles à l'eau augmentent de façon linéaire; il en est de même pour les pectines solubles dans l'oxalate d'ammonium (acides pectiques et acides pectiniques à faible teneur en méthoxyles), mais la pente de la droite est plus faible.

Il est difficile de relier l'augmentation des pectines solubles à celle des enzymes pectolytiques; Datounashvili et Tyurina (1973) indiquent cependant une augmentation de l'activité de la pectine méthyl estérase au début de la maturation au moment de l'hydrolyse intense des pectines suivi d'une diminution. La polygalacturonase a été décelée dans les baies ayant atteint leur maturité technologique (Marteau, 1967; Tyurina, 1977). La diminution de l'acidité pourrait également, selon Meurens et Vanbelle (1972), entraîner les ruptures des liaisons cationiques essentiellement calciques déterminant la solubilisation des pectines.

En ce qui concerne les moûts, Gaivoronskaya (1972) observe une augmentation du taux des colloïdes au cours de la maturation parallèlement à celle de la viscosité. Bien que le moût s'enrichisse en composés colloïdaux, il se clarifie d'autant mieux que l'on se rapproche de la récolte comme l'ont montré Marteau, Scheur et Olivieri (1963). La quantité de méthanol libéré augmente mais il n'y a pas de corrélation entre l'activité de la pectine méthyl estérase et la vitesse de libération du méthanol. On observe aussi, d'après Cordonnier (1978), une augmentation du rendement en moût obtenu par pressurage lors des contrôles de maturité.

Au cours de la surmaturation, Semichon et Flanzy (1927) signalent que certains cépages qui passerillent bien (*Muscat, Malvoisie*) donnent des moûts très riches en pectine. Mehlitz (1933), Gaivoronskaya (1970) ont fait des observations analogues.

Pour ce qui est des polyosides neutres, Filippova (1971) indique que les hémicelluloses de deux cépages (*Aligoté* et *Rkatsiteli*) s'accumulent dans les baies proportionnellement à l'enrichissement en sucres solubles.

## V. — Composition des baies à maturité

### A. — *Substances pectiques, polyosides hydrosolubles*

En comparant les jus de plusieurs fruits, Peynaud (1951) a montré que le raisin était moins riche en substances pectiques que les fruits à noyau et les agrumes. D'après Baltaga et Yarotskaya (1970), les teneurs en pectines sont comprises entre 0,17 et 0,23 p. 100 du poids frais (la teneur moyenne des fruits est de 0,5 p. 100) soit 0,88 à 1,29 p. 100 de la matière sèche des baies; la protopectine forme la majeure partie des pectines totales (60 à 78 p. 100). Les substances pectiques du gâteau de pressurage des baies selon Lapsker, Baltaga et Trofimenko (1970) représentent 2,29 p. 100 du poids sec, compte tenu des rendements d'extraction successivement par l'eau chaude, le citrate d'ammonium et l'acide chlorhydrique ainsi que des teneurs en pectines des différentes fractions. Ces auteurs proposent de remplacer pour l'étude des enzymes pectolytiques utilisées en vinification les pectines de pomme par les pectines de raisin que l'on pourrait extraire industriellement à partir des marcs.

TAGLEAU I

*Teneur en polyosides des moûts et des baies de raisin en g/kg*
d'après ZINTCHENKO, GRAMATSKA et KESHISHEVA (1975)

| | Variante | Polyosides des Moûts | Polyosides des parties solides des baies extraits par | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Eau | | Ammonium | | KOH | | $H_2SO_4$ |
| | | | Froide ($P_1$) | Chaude ($P_2$) | Oxalate ($P_3$) | H Cl 0,03 N + citrate ($P'_3$) | N ($P_4$) | 4 N ($P_5$) | à 72 p. 100 ($P_6$) |
| A) Polyosides neutres : | | | | | | | | | |
| ● *Traminer rose* . . . | I | 0,18 | 0,23 | 2,06 | 1,51 | — | 3,77 | 2,23 | 6,94 |
| | II | 0,12 | 0,33 | 2,61 | — | 3,55 | — | — | — |
| ● *Rkatsilite* . . . . . | I | 0,68 | 0,35 | 1,50 | 1,20 | | 5,63 | 1,56 | 4,39 |
| | II | 0,67 | 0,50 | 1,53 | — | 1,86 | — | — | — |
| ● *Cabernet Sauvignon* . | I | 0,34 | 0,43 | 0,54 | 3,02 | — | 3,94 | 0,89 | 6,10 |
| | II | 0,21 | 0,43 | 0,79 | — | 3,46 | — | — | — |
| B) Substances pectiques : | | | | | | | | | |
| ● *Traminer rose* . . . | — | — | 3,31 | 1,24 | 3,91 | 1,31 | — | — | — |
| ● *Rkatsiteli* . . . . . | — | — | 1,52 | 0,55 | 4,10 | 1,41 | — | — | — |
| ● *Cabernet Sauvignon* . | — | — | 1,71 | 0,51 | 4,71 | 1,20 | — | — | — |

TABLEAU 2

*Caractéristiques physico-chimiques des polyosides des moûts et des baies*
d'après ZINTCHENKO, GRAMATSKAYA et KESHISHEVA (1975)

| Variété | Indice (résultat en p. 100 de la matière sèche) | Polyorides des Moûts | Polyorides des parties solides des baies extraits par | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Eau | | Ammonium | | KOH | | 72 % $H_2SO_4$ |
| | | | Froide | Chaude | Oxalate | HCl 0,03 N + citrate | N | 4N | |
| *Traminer rose* | Somme des oses | 16,70 | 12,80 | 8,97 | 14,10 | 7,50 | 3,2 | 9,7 | 6,9 |
| | Carboxyles libres | 0,81 | — | 3,00 | 2,48 | 1,83 | — | — | — |
| | Carboxyles liés | 2,70 | — | 6,70 | 7,60 | 5,75 | — | — | — |
| | Total carboxyles | 3,51 | — | 9,70 | 10,10 | 7,58 | — | — | — |
| | Méthoxyles | 1,86 | — | 4,60 | 5,25 | 3,96 | — | — | — |
| | Degré d'estérification | 77,00 | — | 69,00 | 76,00 | 76,00 | — | — | — |
| | Somme des acides uroniques | 14,50 | — | 40,60 | 41,00 | 31,60 | 4,3 | 0,8 | 0 |
| | Cendres | — | — | 11,15 | 1,70 | 2,39 | 27,62 | 38,20 | 16,76 |
| | Azote | — | — | 0,69 | 1,39 | 2,61 | 4,12 | 2,50 | 2,25 |
| | Humidité (en p. 100 de colloïde précipité) | — | — | 8,06 | 6,90 | 12,08 | 6,97 | 3,00 | 4,78 |
| *Cabernet Sauvignon* | Somme des oses | 21,00 | 10,23 | 11,06 | 7,63 | 4,70 | 2,99 | 11,20 | — |
| | Carboxyles libres | 1,06 | 0,57 | 0,64 | 1,71 | 1,30 | — | — | — |
| | Carboxyles liés | 2,50 | 3,24 | 5,02 | 7,10 | 5,05 | — | — | — |
| | Total carboxyles | 3,56 | 3,81 | 5,66 | 8,81 | 6,35 | — | — | — |
| | Méthoxyles | 1,72 | 2,23 | 3,46 | 4,90 | 3,48 | — | — | — |
| | Degré d'estérification | 70,00 | 85,00 | 89,00 | 80,70 | 79,50 | — | — | — |
| | Somme des acides uroniques | 14,80 | 16,00 | 23,60 | 37,00 | 25,80 | 1,50 | 3,10 | |
| | Cendres | 3,80 | 2,80 | 2,70 | 1,20 | 2,75 | 16,00 | — | — |
| | Azote | 4,58 | 4,44 | 1,30 | 2,94 | 1,81 | 0,80 | — | — |
| | Humidité (en p. 100 de colloïde précipité) | 14,90 | 15,40 | 17,70 | 17,60 | 15,30 | 9,50 | 10,00 | — |

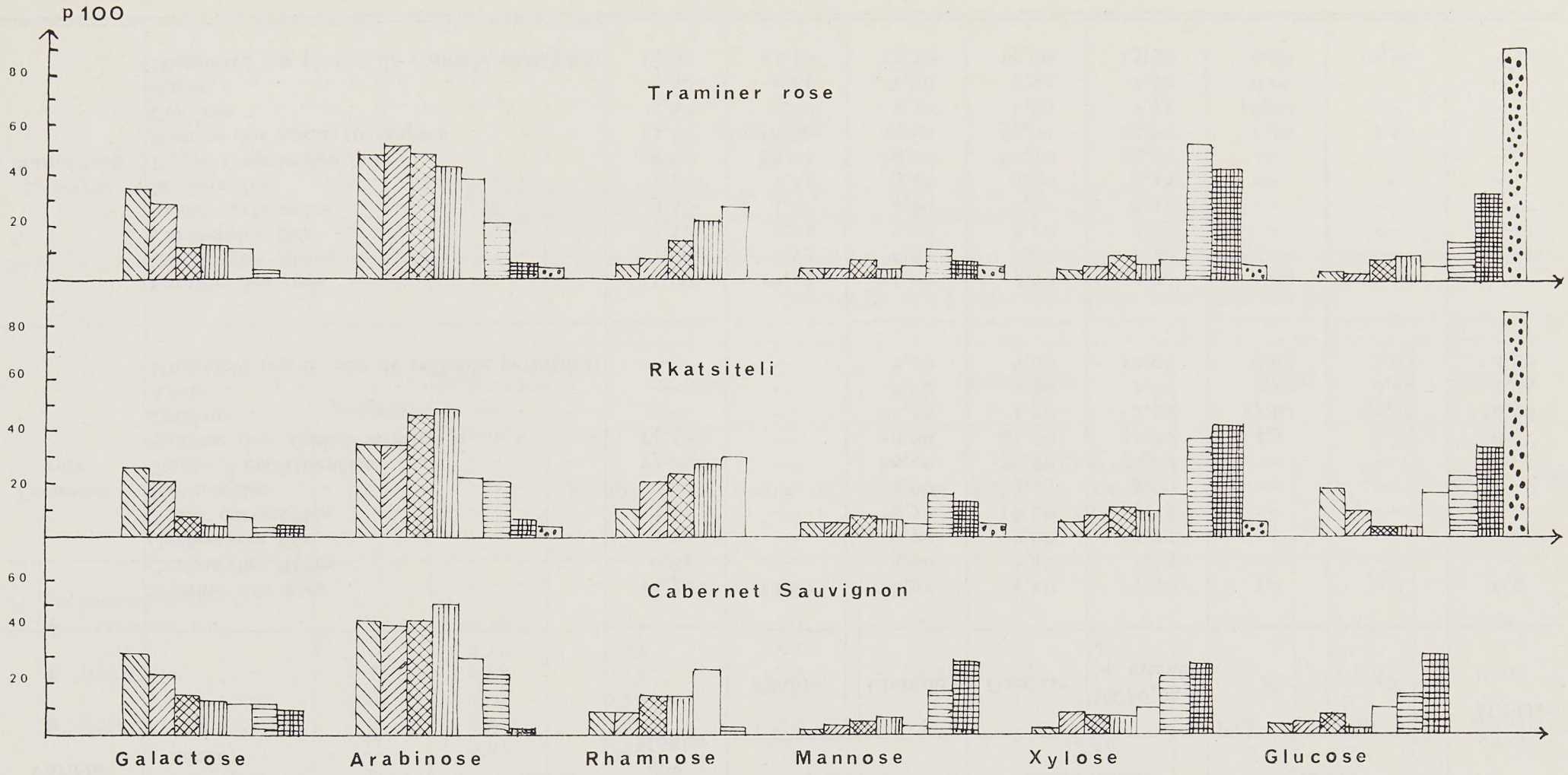



FIG. 4. — *Composition des polyosides des baies en p. 100 des monoses totaux* d'après ZINTCHENKO, GRAMATSKAYA, KESHISHEVA (1975).

Comparées aux pectines de la betterave, les pectines de raisin d'après les études de Filippova et Skolenko (1968) faites par spectrométrie infra rouge sont estérifiées à un taux plus élevé; elles ont un degré d'ionisation des groupements carboxyles plus élevé et davantage de groupements méthoxyles. Les pectines du raisin contiennent aussi de l'acide acétique comme celle du tabac et de la betterave à sucre (Deuel, Solms et Altermatt, 1953).

L'eau froide et chaude extraient des pectines associées à d'autres polyosides neutres dont la composition a été étudiée par Barbera (1933), Solms, Buchi et Deuel (1952), Corrao (1954), Zintchenko et Alekseitchouk (1969); ces composés contiennent de l'arabinose, du galactose, du xylose, du glucose et du rhamnose.

Zintchenko, Gramatskaya et Keshisheva (1975), Zintchenko *et al.* (1975) ont étudié les polyosides hydrosolubles en séparant les moûts et en traitant les gâteaux de pressurage des marcs comme l'indique le schéma de la figure 2. D'après le tableau 1, l'eau chaude extrait davantage de polyosides que l'eau froide, le citrate d'ammonium acidifié davantage que l'oxalate. Les valeurs trouvées sont très différentes selon les cépages aussi bien pour les substances pectiques que pour les polyosides neutres. En ce qui concerne la composition des fractions isolées (tabl. 2), la plus grande partie des polyuronides est extraite par les sels d'ammonium (jusqu'à 40 p. 100 pour le *Traminer rose*). Les degrés d'estérification sont élevés sur l'ensemble des fractions (70 à 89 p. 100), les indices de méthoxyles bas pour les polyosides des moûts, les teneurs en azote comprises entre 0,69 et 4,58 p. 100. D'après le graphique de la figure 4, l'arabinose et le galactose constituent 55,2 et 83,4 p. 100 de l'ensemble des oses; on constate que la composition en différents oses est identique dans les fractions extraites par l'eau froide et chaude. Dans les fractions extraites par les sels d'ammonium, le rapport des oses est différent; les teneurs en arabinose et en rhamnose sont élevées.

Les polyosides hydrosolubles sont importants au point de vue technologique car une partie passe dans les moûts; aussi Zintchenko et Alekseitchouk (1975) appellent réserve technologique en polyosides hydrosolubles l'ensemble des fractions extraites sur les moûts et sur les gâteaux de pressurage des baies en les traitant successivement par l'eau froide, l'eau froide après broyage, l'eau chaude et l'oxalate d'ammonium. Toutes ces conditions opératoires favorisent la dissolution des polymères glucidiques à haut poids moléculaire dans les conditions les plus douces empêchant l'hydrolyse acide des liaisons osidiques ou bien la destruction alcaline des oses. La réserve technologique en polyosides hydrosolubles est comprise entre 2,09 et 2,90g/kg de baie (tabl. 3); elle varie selon le cépage de même que les différentes fractions. Le moût renferme 23,0 à 25,4 p. 100 du total des polyosides hydro-solubles; l'eau froide en extrait 16,4 à 35,4 p. 100, l'eau chaude 20,5 à 42,0 p. 100, l'oxalate d'ammonium 11,5 et 21,2 p. 100. Dans le moût l'arabinose et le galactose prédominent (tabl. 4), mais le rapport de ces deux oses varie peu (rapport 2/1 ou 1,5/1). L'eau froide extrait davantage de glucose et de mannose (la somme des deux est 2,5 fois plus élevée que dans les moûts) et du xylose (jusqu'à 11,4 p. 100). L'eau chaude et l'oxalate d'ammonium extraient davantage de polyuronides (jusqu'à 19 p. 100) avec une quantité inhabituelle d'arabinose (50-58 p. 100) et de rhamnose (18-20 p. 100).

Pour ce qui est de la structure de ces composés, les résultats de l'oxydation périodique laissent supposer une structure ramifiée. En outre, ces substances sont hétérogènes du point de vue poids moléculaire comme le montrent les résultats obtenus par filtration sur gel de sephadex G 150. Les courbes de la figure 5 montrent que, pour chaque extraction, on obtient trois fractions de poids moléculaire différent (haut, moyen, bas). Dans le moût, on trouve à égale concentration des frac-

TABLEAU 3

*Réserve technologique des polyosides hydrosolubles du raisin en g/kg* d'après ZINTCHENKO et ALEKSEITCHOUK (1975)

| Variété | Moût à partir d'un kg | Gâteau de pressurage | | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Eau froide | Eau froide après émiettement | Eau chaude | Oxalate d'ammonium à 0,5 p. 100 | |
| *Aligoté* | 0,485 | 0,445 | 0,238 | 0,433 | 0,451 | 2,118 |
| *Rkatsiteli* | 0,731 | 0,128 | 0,246 | 1,358 | 0,335 | 2,908 |
| *Traminer rose* | 0,658 | 0,322 | 0,103 | 1,085 | 0,417 | 2,585 |
| *Riesling italien* | 0,482 | 0,201 | 0,235 | 0,723 | 0,450 | 2,091 |

tions à haut et à bas poids moléculaire. Dans les baies, la proportion des fractions varie selon les variétés. Le cépage *Rkatsiteli* est caractérisé par des fractions à haut poids moléculaire, l'*Aligoté* par des fractions à poids moléculaire moyen, le *Traminer rose* par des fractions à bas poids moléculaire et partiellement à haut poids moléculaire.

## B. — *Polyosides alcalisolubles, hémicelluloses*

Les hémicelluloses constituent une fraction importante des parois cellulaires après extraction à l'alcool (10,5 à 14,8 p. 100 selon BALTAGA et YAROTSKAYA, 1973) alors que la proportion de la cellulose et de la lignine est respectivement de 5,7 à 11,5 et de 10,3 à 14 p. 100.

Les teneurs totales après traitement à l'eau et au citrate d'ammonium sont d'après ZINTCHENKO et GRAMATSKAYA (1971) de 7,0 et 9,9 g/kg de baie pour le *Noah* et l'*Aligoté*. Les fractions facilement solubles (hémicelluloses A) et difficilement solubles (hémicelluloses B) sont identiques pour l'*Aligoté* alors que les hémicelluloses B sont presque deux fois plus élevées pour le *Noah*. La composition des différentes fractions a été donnée par ZINTCHENKO, GRAMATSKAYA et KESHISHEVA (1975). Pour la fraction A, la plus importante (tabl. 1), le xylose et l'arabinose représentent 48,5 à 72,8 p. 100 de l'ensemble des oses (fig. 4), pour la fraction B, le taux est plus faible (29,9 à 33,0 p. 100). Les hémicelluloses renferment 0,1 à 4,3 p. 100 d'acides uroniques et un taux important de cendres (tabl. 2).

## C. — *Cellulose*

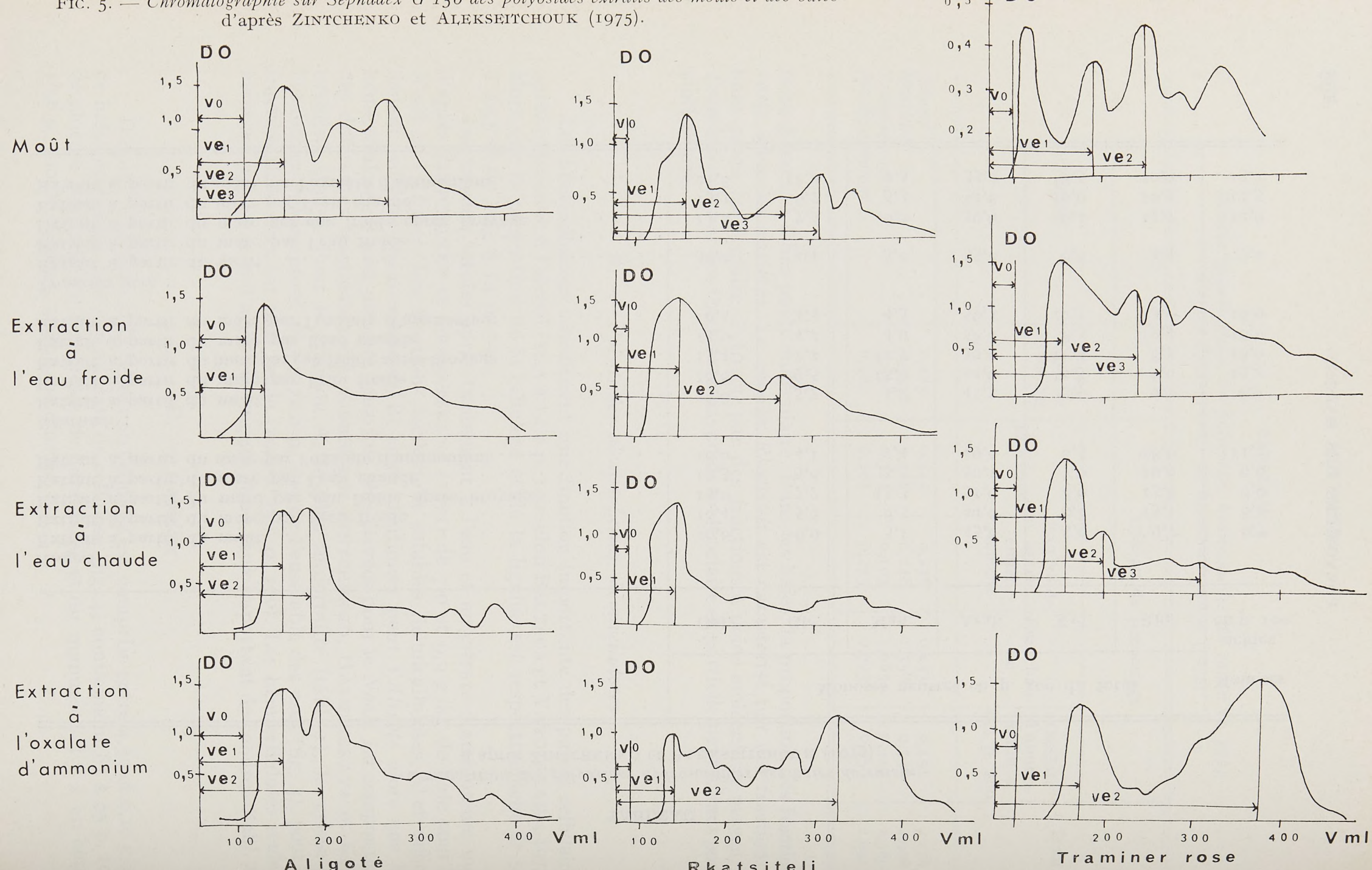
D'après le tableau 1, la teneur en cellulose est comprise entre 4,39 et 6,10 g/gk de baies épépinées. Les hydrolysats de cellulose (fig. 4) contiennent 82 à 85 p. 100 de glucose avec comme impuretés de l'arabinose et du mannose, Il y a en outre 16,8 p. 100 de cendres, 2,2 p. 100 d'azote.

TABLEAU 4

*Composition des polyosides hydrosolubles des baies de raisin*
d'après ZINTCHENKO et ALEKSEITCHOUK (1975)

| | Monoses neutres en p. 100 du total | | | | | | Monoses acides en p. 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Gal. | Glc. | Man. | Arab. | Xyl. | Rha. | |
| *Aligoté* : | | | | | | | |
| Extrait à partir du moût | 26,8 | 6,9 | 5,1 | 45,8 | 5,0 | 9,7 | 6,7 |
| Extrait à partir du marc par l'eau froide | 18,4 | 5,8 | 8,3 | 44,6 | 9,8 | 13,1 | 8,8 |
| Extrait à partir du marc par eau froide après broyage | 15,0 | 7,7 | 13,3 | 51,6 | 8,6 | 13,8 | 8,0 |
| Extrait à partir du marc par l'eau chaude | 13,3 | 5,8 | 3,3 | 50,1 | 7,6 | 19,9 | 9,9 |
| Extrait à partir du marc par l'oxalate d'ammonium | 18,0 | 4,1 | 2,4 | 49,0 | 8,5 | 18,0 | 12,2 |
| *Rkatsiteli* : | | | | | | | |
| Extrait à partir du moût | 36,8 | 5,7 | 1,6 | 41,5 | 5,0 | 9,4 | 8,6 |
| Extrait à partir du marc par l'eau froide | 18,8 | 9,5 | 15,0 | 44,6 | 5,5 | 6,6 | 15,4 |
| Extrait à partir du marc par eau froide après broyage | 15,4 | 12,2 | 12,7 | 39,6 | 11,4 | 8,7 | 18,0 |
| Extrait à partir du marc par l'eau chaude | 14,0 | 4,2 | 4,9 | 58,0 | 8,5 | 10,4 | 18,0 |
| Extrait à partir du marc par l'oxalate d'ammonium | 10,5 | 4,4 | 4,5 | 56,3 | 12,1 | 13,0 | 18,9 |
| *Traminer rose* : | | | | | | | |
| Extrait à partir du moût | 30,2 | 4,4 | 5,2 | 55,0 | 0,8 | 4,4 | 7,2 |
| Extrait à partir du marc par l'eau froide | | | | | | | |
| Extrait à partir du marc par eau froide après broyage | 13,8 | 7,5 | 6,2 | 50,6 | 6,2 | 15,7 | 12,6 |
| Extrait à partir du marc par l'eau chaude | 15,3 | 6,7 | 5,3 | 52,8 | 10,0 | 10,5 | 12,5 |
| Extrait à partir du marc par l'oxalate d'ammonium | 21,8 | 11,2 | 4,5 | 33,0 | 8,5 | 20,0 | 13,2 |

FIG. 5. — *Chromatographie sur Sephadex G 150 des polyosides extraits des moûts et des vins d'après* ZINTCHENKO et ALEKSEITCHOUK (1975).




$V_0$ : volume libre de la colonne.
$Ve_1$ : volume de sortie de la fraction à haut poids moléculaire.
$Ve_2$ : volume de sortie de la fraction à poids moléculaire moyen.
$Ve_3$ : volume de sortie de la fraction poids moléculaire faible.

## VI. — Composition des différentes parties de la baie

### A. — *Répartition*

Comboni en 1896 avait déjà signalé la richesse en pentosanes des pépins et des pellicules comparativement à celle des pulpes.

Tarantola et Usseglio-Tomasset (1963 *a*) ont étudié la répartition de l'ensemble des colloïdes précipitables par l'alcool sur des pulpes homogénéisées, sur des extractions à l'eau chaude à partir de pellicules et de pépins séchés après broyage dans l'acétone. Par rapport à la totalité des colloïdes extraits, ceux de la pulpe représentent environ 40 p. 100, ceux des pellicules 30 à 35 p. 100, ceux des pépins un peu moins (tabl. 5). Leur concentration dans les pellicules et les pépins est importante car ils représentent respectivement 7 à 11 p. 100 et 2 à 6 p. 100 du poids des baies. En utilisant la méthode de Zitko (étude des spectres d'absorption des pentoses, des hexoses et de l'acide galacturonique chauffés en présence d'acide sulfurique), ces auteurs ont montré que les pectines sont abondantes dans les pulpes et les pellicules, un peu moins dans les pépins alors que les arabanes sont en faible quantité dans les pulpes et les pellicules; les galactanes sont présentes dans les pulpes, les pellicules et les pépins. Les protéines sont surtout abondantes dans les pépins car il y a accumulation de substances protéiques de réserve.

D'après ces mêmes auteurs (Tarantola et Usseglio-Tomasset, 1963 *b*), l'activité de la pectine méthyl-estérase de la pellicule est 1,6 et 1,8 fois plus élevée que celle de la pulpe alors que celle des pépins est le quart de celle de la pulpe. On retrouve les observations analogues faites pour les différentes parties des citrons (Rouse et Knorr, 1969).

### B. — *Composition des pellicules*

Une partie des polyosides des pellicules constituées par des tissus aqueux et fragiles plus ou moins dilacérés au cours du foulage passe dans les moûts au cours de la macération, d'où l'intérêt de connaître leur composition. D'après Ezhov, Datounashvili et Pavlenko (1973), les polyosides sont les composés les plus abondants (jusqu'à 44 p. 100 du poids sec); on trouve ensuite par ordre d'importance décroissante la lignine, les composés azotés et les substances minérales (tabl. 6). La quantité de polyosides faciles à hydrolyser et la composition des hydrolysats correspondants varient selon les cépages. Les polyosides difficiles à hydrolyser constitués par des polymères hétérogènes contenant de la cellulose liée à de la protopectine sont plus stables, car ils participent moins que les prédédents aux réactions métaboliques. La composition des polyosides faciles à hydrolyser des moûts est très proche de celles des pellicules (Datounashvili, 1973; Datounashvili et Ezhov, 1974 *a*).

En utilisant le schéma de fractionnement de la figure 1, Ezhov et Datounashvili (1974) ont séparé plusieurs fractions de pectines et d'hémicelluloses. D'après le tableau 7, la quantité d'acide galacturonique, de galactose et d'arabinose augmente de la fraction pectine soluble à la fraction protopectine 2; inversement le glucose et le mannose diminuent. Au moyen de la chromatographie sur D.E.A.E. cellulose, ces auteurs ont mis en évidence la grande hétérogénéité de ces

TABLEAU 5

*Composition des polyosides extraits des différentes parties des baies de raisin*
d'après TARANTOLA et USSEGLIO-TOMASSET (1963*a*)

| Cépage et date de la cueillette | Pulpe | | | | | Pellicule | | | | | Pépins | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Concentration en p. 100 des colloïdes totaux | | | | | Concentration en p. 100 des colloïdes totaux | | | | | Concentration en p. 100 des colloïdes totaux | | | | |
| | Arabanes | Galactanes | Pectines | Protéines | Somme des 4 colloïdes | Arabanes | Galactanes | Pectines | Protéines | Somme des 4 colloïdes | Arabanes | Galactanes | Pectines | Protéines | Somme des 4 colloïdes |
| *Dolcetto* (27-9-62) . . . . . | 6,0 | 14,2 | 46,5 | 12,2 | 78,9 | 11,8 | 9,4 | 46,3 | 2,9 | 70,4 | 3,6 | 22,6 | 11,3 | 38,0 | 75,5 |
| *Cortese* (1-10-62) . . . . . | 8,5 | 16,1 | 47,4 | 8,2 | 80,2 | 12,3 | 14,5 | 51,6 | 4,1 | 82,5 | — | 19,3 | 25,9 | 63,7 | 108,9 |
| *Barbera* (4-10-62) . . . . . | 3,2 | 14,9 | 43,6 | 15,2 | 76,9 | 6,7 | 17,4 | 56,4 | 4,0 | 84,5 | 1,5 | 27,9 | 25,8 | 27,6 | 82,8 |

TABLEAU 6

*Composition des pellicules de certaines variétés*
d'après EZHOV, DATOUNASHVILI et PAVLENKO (1973)

| | *Sépéravi* | *Muscat d'Alexandrie* | *Cabernet* | *Muscat blanc* |
|---|---|---|---|---|
| A. *Composition globale en p. 100 de poids sec* : | | | | |
| Polyosides | | | | |
| — faciles à hydrolyser (*) | 16,1 | 20,0 | 19,8 | 17,7 |
| — difficile à hydrolyser (**) | 24,7 | 23,8 | 24,9 | 24,8 |
| Azote total | 1,8 | 1,6 | 1,5 | 1,4 |
| Lignine | 36,5 | 35,4 | 36,1 | 35,1 |
| Cendres | 2,7 | 2,6 | 2,7 | 2,6 |
| B. *Composition des hydrolysats de polyosides en mg/g de poids sec* : | | | | |
| *Fraction facile à hydrolyser* | 160,9 | 200,3 | 198,8 | 197,5 |
| Acide galacturonique | 30,4 | 33,6 | 29,9 | 38,0 |
| Galactose | 14,5 | 20,6 | 6,5 | 5,8 |
| Glucose | 16,1 | 22,8 | 20,2 | 21,3 |
| Mannose | 5,7 | 11,3 | 25,4 | 22,0 |
| Arabinose | 54,0 | 67,2 | 70,2 | 60,0 |
| Xylose | 40,2 | 44,8 | 46,6 | 50,4 |
| *Fraction difficile à hydrolyser* | 247,3 | 237,4 | 248,7 | 239,1 |
| Acide galacturonique | 50,4 | 36,7 | 50,2 | 35,3 |
| Glucose | 104,3 | 88,4 | 96,0 | 80,1 |
| Mannose | 49,4 | 58,3 | 42,4 | 60,7 |
| Xylose | 43,2 | 54,0 | 60,1 | 63,0 |

(*) HCl à 2 p. 100.
(**) $H_2SO_4$ 72 p. 100 puis $H_2SO_4$ à 5 p. 100.

fractions. On obtient quatre sous-fractions pour les pectines solubles et la protopectine 1, trois pour la protopectine 2 (fig. 6). La composition des fractions (tabl. 8) permet de supposer que les polyosides acides des pellicules sont constitués par des arabinogalacturonanes et des galactogalacturonanes avec de petites quantités de glucanes, de mannanes et éventuellement de glucomannanes. Ces hypothèses ont été confirmées lors de l'hydrolyse de pellicules par des préparations d'enzymes pectolytiques commerciales; il y a en effet, pendant les premières heures, un passage intense d'acide galacturonique et d'arabinose puis au bout de 12 h la présence de glucose.

Plusieurs sous-fractions d'hémicelluloses $B_1$ et $B_2$ ont été séparées par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose et par électrophorèse sur papier (fig. 6 et tabl. 8); leur composition permet de supposer que les hémicelluloses sont constituées par des galactoglucomannanes, des glucanes, des arabinogalactanes avec l'existence possible d'arabinoglucanes et d'arabinoxylanes.

TABLEAU 7

*Composition des polyosides extraits des pellicules en p. 100 par rapport au poids de chaque fractions*
d'après EZHOV et DATOUNASHVILI (1974)

| | Pectine soluble | Protopectine 1 | Protopectine 2 | Hemicelluloses A | | Hemicelluloses $B_1$ | Hemicelluloses $B_2$ | Cellulose | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Facilement hydrolyables | | Facilement hydrolysab. | Difficilement hydrolysab. | | | Facilement hydrolysab. | Difficilement hydrolysab. |
| Acide galacturonique | 17,5 | 20,6 | 31,3 | — | — | — | — | — | — |
| Galactose | 9,6 | 10,1 | 14,4 | 23,3 | 14,4 | 10,7 | 8,9 | 10,7 | — |
| Glucose | 14,8 | — | — | 30,1 | 9,4 | 17,2 | 14,2 | 14,6 | 39,5 |
| Mannose | 17,9 | 11,6 | — | — | 22,9 | 23,8 | 32,6 | 17,5 | 26,5 |
| Arabinose | 30,4 | 37,1 | 39,8 | 26,1 | 39,6 | 25,1 | 24,3 | 25,9 | — |
| Xylose | 9,8 | 20,6 | 14,5 | 20,5 | 22,7 | 23,2 | 20,0 | 31,3 | 33,6 |

TABLEAU 8

*Composition des fractions de différents polyosides des baies après séparation par chromatographie sur colonne de D.E.A.E. cellulose et par électrophorèse sur papier*
d'après EZHOV et DATOUNASHVILI (1974)

| | Fraction | Ac. Gal. | Gal. | Glc. | Man. | Arab. | Xyl. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1° *Chromatographie sur D.E.A.E. cellulose* : | | | | | | | |
| — Pectines solubles | I | — | +++ | ++ | ++ | ++ | + |
| | II | — | +++ | — | — | ++ | + |
| | III | +++ | — | — | — | ++ | ++ |
| | IV | +++ | ++ | — | +++ | ++ | + |
| — Protopectine 1 . | I | — | +++ | — | +++ | ++ | ++ |
| | II | +++ | + | — | — | ++ | + |
| | III | +++ | — | — | — | + | — |
| | IV | +++ | ++ | — | — | + | + |
| — Protopectine 2 . | I | — | +++ | — | — | ++ | + |
| | II | — | +++ | — | — | ++ | ++ |
| | III | +++ | ++ | — | — | + | ++ |
| — Hémicelluloses $B_1$ . . . . . | I | — | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| | II | — | ++ | — | — | +++ | — |
| — Hémicelluloses $B_2$ | I | — | ++ | +++ | + | +++ | ++ |
| | II | — | + | +++ | ++ | +++ | + |
| | III | — | — | +++ | + | ++ | + |
| 2° *Electrophorèse* : | | | | | | | |
| — Hémicelluloses $B_1$ . . . . . | C | — | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ |
| | IA | — | — | +++ | + | +++ | + |
| | IIA | — | — | +++ | + | ++ | + |
| | IIIA | — | ++ | ++ | — | +++ | + |
| | K | — | +++ | + | — | — | — |
| — Hémicelluloses $B_2$ . . . . . | C | — | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| | IA | — | — | +++ | — | ++ | +++ |
| | IIIA | — | + | +++ | — | + | ++ |
| | K | — | — | +++ | — | + | ++ |

(***) : Doses importantes; (**) : Doses moyennes; (*) : Doses faibles; (—) Absence; (C) Ligne de départ; (IA, IIA, IIIA) Zone cathodique; (K) Zone anodique.

## VII. — Influence des conditions de culture

La fumure azotée sous toutes ses formes et le fumier ne provoquent pas de modifications sensibles de la teneur en pectines des baies du *Concord* selon HOPKINS et GOURLEY (1930); par contre, un mode de conduite de ce cépage sur fil de

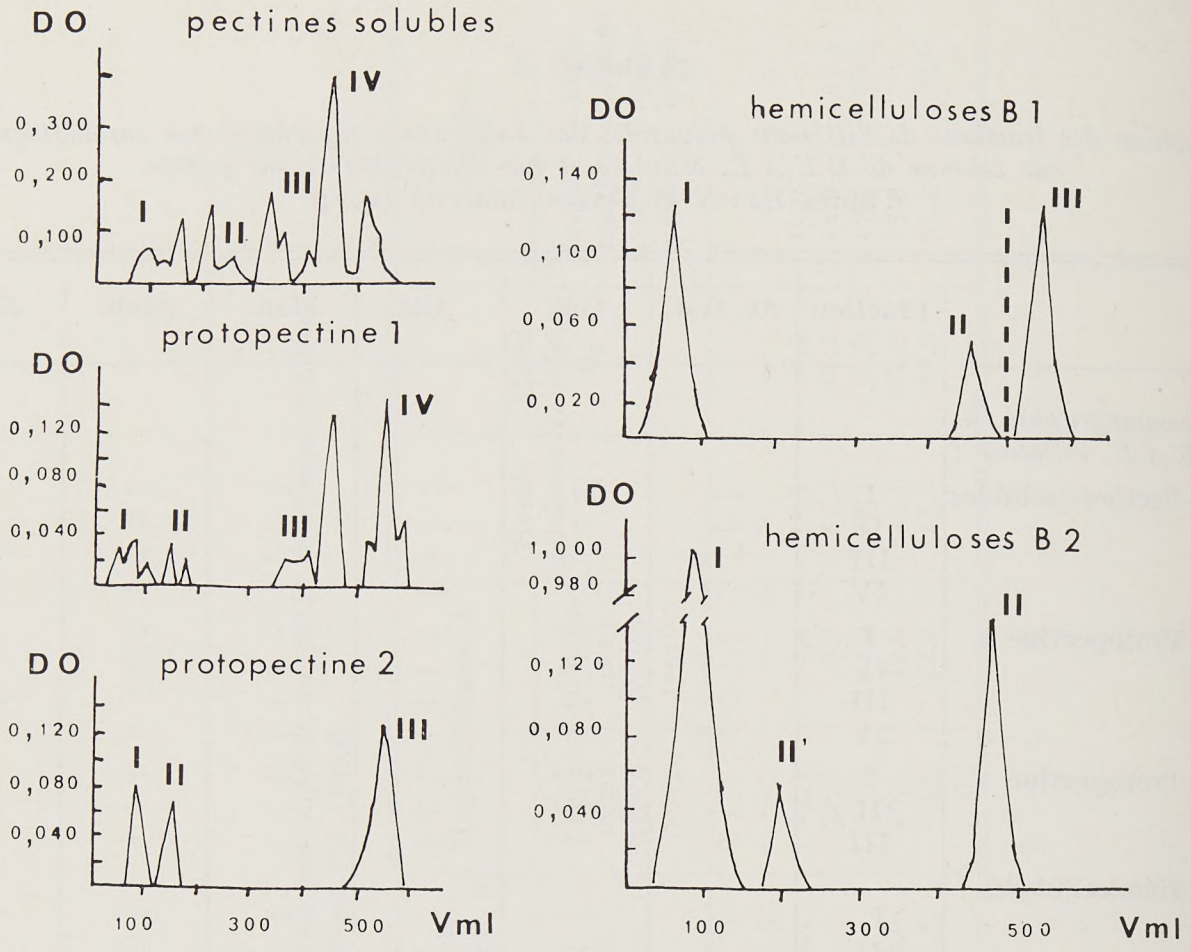



FIG. 6. — *Chromatographie sur D.E.A.E. cellulose de différentes fractions de polyosides de pellicules* d'après EZHOV et DATOUNASHVILI (1974).

En abscisse volume d'élution.
En ordonnée : densité optique obtenue par détection à l'anthrone à 620 nm.
Pour les composés pectiques :
pic I élution par l'eau,
pics II à IV élution par un tampon phosphate avec gradient linéaire de concentration 0,005 — 0,09 M additionné d'EDTA (0,001 M).
Pour les hémicelluloses :
pic I élution par l'eau,
pic II élution tampon borate avec gradient linéaire de concentration 0,2 - 0,8 M pH 10,2.

fer augmente le taux des différentes fractions de pectines, de sucre et de pigments anthocyaniques par suite d'une meilleure disposition du feuillage (SMIT et COUVILLON, 1971). Ce mode de conduite est recommandé lorsqu'on utilise ces raisins pour l'élaboration de gelées et de confitures.

Dans le cas d'un raisin de table (*Karabournou* ou *Rosaki*), MILOVANOVA, BONDARENKO et GRAMATSKAYA (1967) indiquent qu'un engrais contenant 9 p. 100 d'azote, 6 p. 100 d'acide phosphorique et 9 p. 100 de potasse augmente la teneur totale des baies en polyosides. La charge des souches et l'engrais ajouté influent nettement sur la distribution des différentes fractions de ces composés. La surcharge en raisins provoque un accroissement des formes insolubles (protopectine, hemicelluloses, cellulose) ainsi qu'une diminution de la qualité des raisins (mauvaise aptitude au transport, ramollissement de la pulpe). Pour d'autres variétés (*Coarna negra, Dattier de Beyrouth, Muscat de Hambourg, Chasselas*), les conditions de culture affectent davantage les teneurs en pectines et en hémicelluloses que les variétés; en outre, selon les années, quand il y a davantage de lignine il y a moins de cellulose (BALTAGA et YAROTSKAYA, 1970, 1971, 1973).

Pour plusieurs cépages de cuve, le taux global de polyosides est selon GRAMATSKAYA et ZINTCHENKO (1977) d'abord déterminé par la variété ensuite par la quantité de pluie tombée au cours de la maturation des baies. Le *Cabernet Sauvignon* est le cépage le plus riche (10 à 13,5 g/kg), l'*Aligoté* le plus pauvre (7,2 à 10 g/kg). La répartition de ces composés est variable :

— polyosides du moût : 0,7 à 12,1 p. 100,

— polyosides hydrosolubles : 10,6 à 21,7 p. 100,

— polyosides alcalisolubles : 35,7 à 49,3 p. 100,

— α cellulose : 25,0 à 47,3 p. 100.

Dans la plupart des variétés étudiées, une faible pluviométrie provoque un accroissement des polyosides des baies et spécialement des moûts. C'est ainsi que pour le *Traminer rose*, sur quatre années d'expérimentation, le taux des polyosides du moût varie de 0,7 à 9,8 g/l.

La pluie provoque surtout le développement de la pourriture grise du raisin de plus en plus fréquente car elle est liée à l'augmentation des rendements. C'est la maladie cryptogamique la plus importante du raisin.

## VIII. — Modifications des polyosides des raisins dues à l'attaque de la pourriture grise

Cette maladie est due au développement de deux moisissures (*Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*). On sait depuis LABORDE (1907) que ces parasites provoquent l'apparition d'une substance mucilagineuse dans les vins appelées dextrane précipitable par 25 p. 100 d'alcool et depuis SEMICHON et FLANZY (1927) qu'ils ne forment pas de pectines.

Récemment, DUBOURDIEU (1977), DUBOURDIEU *et al.* (1978) ont montré par culture de *Botrytis cinerea* sur milieu synthétique que ce champignon était capable de former à partir des hexoses, d'une part un glucane de poids moléculaire élevé ($10^6$) précipitable par l'addition d'un demi volume d'alcool au milieu et d'autre part un mélange de polyosides complexes de poids moléculaire plus faible (autour de 20 000) précipitables par des doses croissantes d'alcool contenant principalement du mannose avec des traces de glucose et de rhamnose. Par méthylation et hydrolyse enzymatique, ces auteurs ont montré que ce glucane possédait des liaisons osidiques β 1 → 3 et β 1 → 6.

MONTANT et THOMAS (1977) ont confirmé par hydrolyse enzymatique les types de liaison; ils ont montré par oxydation périodique, diffraction aux rayons X et microscopie électronique que ce glucane était ramifié, amorphe et poreux.

Cependant, outre la formation d'un glucane exocellulaire, DUBOURDIEU (1978) a montré que les polyosides naturels du raisin étaient modifiés; ainsi les pectines sont hydrolysées et il y a apparition d'autres polyosides (tabl. 9). Les polymères glucidiques des moûts de raisins sains renferment peu de mannose, le rapport galactose/mannose étant de 22,6 (tabl. 10). Par contre, dans ceux des moûts de raisins pourris, le mannose tient une grande place (18 p. 100) tandis que le pourcentage de galactose diminue (36 p. 100), le rapport galactose/mannose devenant égal à 2. Dans les pellicules, la teneur en mannose est légèrement supérieure à celle des moûts correspondants pour les raisins sains. On note aussi une proportion de mannose plus élevée dans les pellicules de raisins pourris; le rapport galactose/amnnose passe de 4,5 à 1,3.

TABLEAU 9

*Teneur en polyosides des moûts de raisins sains et parasités par* Botrytis cinerea *d'après* DUBOURDIEU (1978)

| | Glucane en mg/l | Pectine en mg pectate Na/l | Autres polyosides en mg/l |
|---|---|---|---|
| Moût raisins sains . . . . . | 0 | 670 | 340 |
| Moût raisins pourris . . . . . | 387 | 0 | 627 |

TABLEAU 10

*Pourcentages de monomères contenus dans les polyosides des moûts et des pellicules de raisins sains et pourris (après élimination du glucane de* Botrytis *et des pectines)* selon DUBOURDIEU (1978)

| | Arab. | Rha. | Gal. | Man. | Glc. | Ac. gal. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Moûts* : | | | | | | |
| — Raisins sains . . . . . | 24,1 | 4,0 | 52,1 | 2,3 | 3,8 | 13,4 |
| — Raisins pourris . . . . . | 17,4 | 9,4 | 36,0 | 18,0 | 5,7 | 13,2 |
| *Extraction à l'eau de pellicules broyées* : | | | | | | |
| — Raisins sains . . . . . | 23,5 | 6,0 | 39,8 | 8,8 | 6,0 | 15,8 |
| — Raisins pourris . . . . . | 25,0 | 9,7 | 26,2 | 18,3 | 6,0 | 14,1 |

Au microscope électronique, on constate que le glucane reste localisé en raison de sa faible solubilité au voisinage du mycelium sous forme d'un gel. Le développement du champignon sur le raisin parasité reste généralement limité aux 5 à 8 premières assises cellulaires de la pellicule. Le glucane présente une structure en forme de réseau à structure ténue montrant à très fort grossissement des fibres de différentes tailles. Il est responsable des difficultés de filtration des vins de vendange pourrie.

## IX. — Evolution des polyosides au cours de la conservation des raisins de table

Le raisin frais est un produit périssable; pour étaler sa conservation, la réfrigération est le moyen le plus utilisé. La plupart des travaux portent sur les conditions de conservation (températures voisines de 0 °C, humidité importante pour éviter les pertes d'eau, traitement au $SO_2$ pour lutter contre la pourriture grise);

quelques uns indiquent les transformations biochimiques de certains constituants comme les polyosides en particulier.

En ce qui concerne les substances pectiques, il y a généralement une augmentation des pectines solubles (Gaivoronskaya, 1970) observée seulement sur un seul cépage (*Aleppo ou Dattier de Beyrouth*, par Baltaga et Yarotskaya, (1970). De même, Mihalca, Segal et Segal (1977) constatent que l'hydrolyse de la protectine en pectine soluble est lente au cours de la conservation en chambre frigorifique (0 à — 2 °C, 85 à 90 p. 100 d'humidité relative) alors qu'elle est plus importante dans les deux premières semaines au cours d'une conservation à 12-14 °C (fig. 7). La diminution des pectines totales est beaucoup plus prononcée chez les variétés ayant une capacité réduite de conservation (*Chasselas doré*) que chez les variétés se conservant très bien (*Coarna alba*); elle dépend également de la température de conservation. Le *Muscat de Hambourg* (aptitude moyenne à la conservation) possède un taux initial de protopectine et une transformation en pectines solubles intermédiaires.

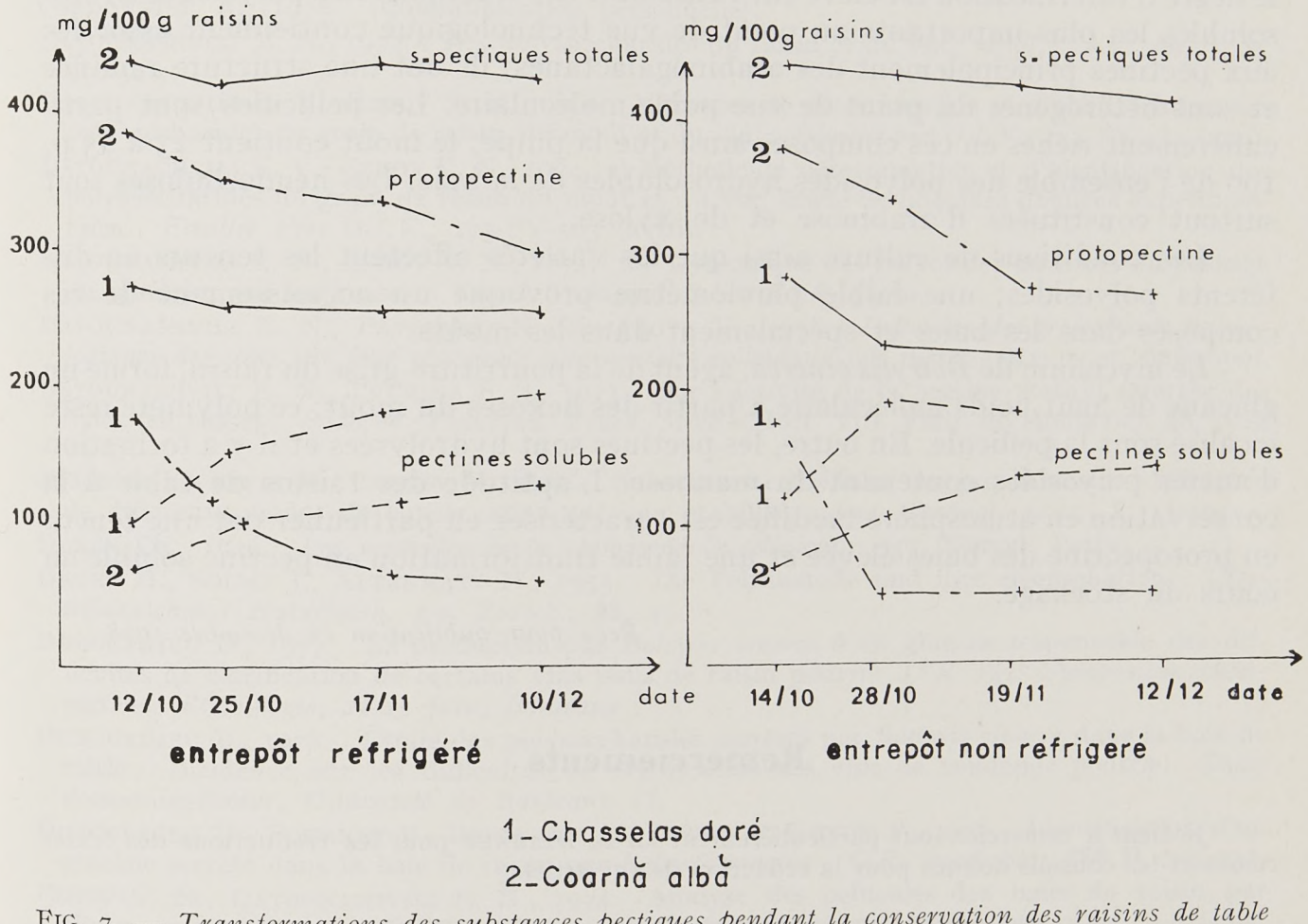



Fig. 7. — *Transformations des substances pectiques pendant la conservation des raisins de table* d'après Milhalca, Segal et Segal (1977)
(*Dosage d'après la méthode de la Fédération Internationale des Producteurs de jus de fruits, 1966*).

Parmi les autres polyosides, Baltaga et Yarotskaya (1971, 1973) constatent une diminution du taux des hémicelluloses et une modification de leur composition (augmentation des arabanes, diminution des glucanes) ainsi qu'une variation irrégulière du taux de cellulose et de lignine.

## X. — Conclusions

La grande diversité des méthodes d'isolement des parois cellulaires, d'extraction et de fractionnement des différents polyosides, d'hydrolyse, d'identification et de dosage des oses, le mode d'expression des résultats rapportés soit au poids humide soit au poids sec, soit au résidu insoluble dans l'alcool soulignent les difficultés rencontrées dans une comparaison des résultats obtenus par différents auteurs. C'est surtout la détermination des polyosides dans les moûts de raisin qui a fait l'objet de nombreux travaux.

Nos connaissances sur l'évolution de ces composés au cours de la maturation sont incomplètes. Parmi les substances pectiques les mieux étudiées, on observe une diminution des pectines totales et une augmentation des pectines solubles mais on a peu d'information sur la structure de ces composés.

A maturité, les raisins sont relativement plus pauvres en pectines que les autres fruits. La majorité de ces composés est constituée par de la protopectine; le degré d'estérification est élevé sur l'ensemble des fractions. Les polyosides hydrosolubles les plus importants au point de vue technologique contiennent associées aux pectines principalement des arabinogalactanes; ils ont une structure ramifiée et sont hétérogènes du point de vue poids moléculaire. Les pellicules sont particulièrement riches en ces composés ainsi que la pulpe; le moût contient 23 à 25 p. 100 de l'ensemble des polyosides hydrosolubles de la baie. Les hémicelluloses sont surtout constituées d'arabinose et de xylose.

Les conditions de culture ainsi que les variétés affectent les teneurs en différents polyosides; une faible pluviométrie provoque un accroissement de ces composés dans les baies et spécialement dans les moûts.

Le mycelium de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise du raisin, forme un glucane de haut poids moléculaire à partir des hexoses du moût; ce polymère reste localisé sous la pellicule. En outre, les pectines sont hydrolysées et il y a formation d'autres polyosides contenant du mannose. L'aptitude des raisins de table à la conservation en atmosphère modifiée est caractérisée en particulier par une teneur en protopectine des baies élevée et une faible transformation en pectine soluble au cours du stockage.

*Reçu pour publication en décembre 1978.*

## Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement M. L. DEIBNER pour les traductions des textes russes et les conseils donnés pour la rédaction de cet article.

## Summary

*Grape berries polysaccharides*

In this review are studied the methods for extraction, identification and determination of grape berries polysaccharides (pectic substances and others hydrosoluble polymeres, hemicelluloses, cellulose), the evolution of this compounds during maturation, their concentration in the different parts of berries (skin, pulp, seeds), the influence of pre-harvest conditions in the vineyards and gray rot (*Botrytis cinerea* development), the evolution during storage of table grapes.

## Références bibliographiques


ASPINALL G. O., 1970. *Polysaccharides*. Pergamon Press ed. Oxford, New-York, Toronto, Sydney, Braunschweig.

BALTAGA S. V., YAROTSKAYA L. V., 1970. Substances pectiques des raisins de table en relation avec les conditions de culture et de conservation (en russe). *Izv. Akad. Nauk. Mold.*, **1**, 7-12.

BALTAGA S. V., YAROTSKAYA L. V., 1971. Caractéristiques des hemicelluloses dans des raisins de table en relation avec les conditions de culture et la durée de conservation (en russe). *Uglvody Sel. Khoz. Rast.*, 3-20, (in *Chem. Abstr.*, 77, 18214 *x*).

BALTAGA S. V., YAROTSKAYA L. V., 1973. Modifications des teneurs en polyosides et en lignine des raisins de table au cours de leur conservation (en russe). *Izv. Akad. Nauk. Mold.*, **3**, 39-44.

BARBERA G., 1933. Ricerche sperimentali sulla pectina dell'uva. *Ann. Tecnica Agr.*, **6**, 1-19.

CARRAO A., 1954. Ricerche sulla pectina insolubile dell'uva. *Ann. del. Sperim. Agr.*, 1-8.

CARTER G. H., 1968. Pectin substances in « Concord » grapes with relation to maturation in 1963. *Proc. Amer. Soc. Hot. Sci.*, **92**, 319-322.

COMBONI C., 1896. Staz. ital. 29,815 cité par VON DER HEIDE C., SCHMITTHENNER F., *Der Wein*, Druk und Verlag von Friedr. Vierveg son Braunschweig, 1922.

CORDONNIER R., 1978. (Communication personnelle).

DATOUNASHVILI E. N., 1973. Les polysaccharides du raisin et du vin. *Bull. O.I.V.*, **46**, (508), 516-522.

DATOUNACHVILI E. V., EZHOV V. N., 1973. Méthodes de détermination et d'identification des polysaccharides du grain de raisin, du moût et du vin. *Feuillet vert O.I.V.*, 173-FV-457 (mai).

DATOUNACHVILI E. V., EZHOV V. N., 1974. *a*) Méthode de détermination et d'identification des polysaccharides du grain de raisin du moût et du vin; étude de quelques données expérimentales. *Feuillet Vert O.I.V.*, 273-FV-503 (avril).

DATOUNASHVILI E. N., EZHOV V. N., 1974. *b*) Dynamique des polyosides au cours du passage du moût au vin (en russe). *Vinod. Vinograd. S.S.S.R.*, **4**, 58-59.

DATOUNASHVILI E. N., PAVLENKO N., MALIKOVA V., 1971. *Influence des traitements technologiques des vins sur leur résistance aux troubles colloïdaux (en russe)*. Krym et Sinferopol.

DATOUNASHVILI E. N., TYURINA S. S., 1973. Sur l'activité de la pectine methyl esterase des baies (en russe). *Sadovod. Vinograd. Vinod. Mold.* (Hort. Viti. Vinif. de Moldavie), **28**, (12), 25-27.

DEIBNER L., RIFAI H., FLANZY M., 1958. Substances colloïdales des jus de raisin. Influence de différents modes de conservation sur leur stabilité. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 15-19.

DORÉE Ch., 1949. *Les méthodes de la chimie de la cellulose*. 537, Dunod, Paris.

DEUEL H., SOLMS J., ALTERMATT M., 1953. Die Pektinstoffe und ihre eigenschaften. *Viertelfahaschimft Naturforsh. ges. Zurich.*, **98**, 49.

DUBOURDIEU D., 1977. La production par *Botrytis cinerea* d'un glucane responsable des difficultés de clarification de certains vins issus de raisin pourri. *C R. III*e *Symposium International d'Œnologie, 21-25 juin, Bordeaux.*

DUBOURDIEU D., 1978. Étude des polysaccharides secrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. Incidence sur les difficultés de clarification des vins de vendange pourrie. *Thèse docteur-ingénieur, Université de Bordeaux II.*

DUBOURDIEU D., FOURNET B., BERTRAND A., RIBEREAU-GAYON P., 1978. Identification d'un glucane secrété dans la baie de raisin par *Botrytis cinerea*. *C.R. Acad. Sci.*, **286 D**, 229-231.

EZHOV V. N., DATOUNASHVILI E. N., 1974. Analyse des pellicules des baies de raisin par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose et électrophorèse sur papier (en russe). *Priklad. Biokh. Mikrob.*, **6**, 908-913.

EZHOV V. N., DATOUNASHVILI E. N., PAVLENKO N. M., 1973. Sur la composition chimique des pellicules des baies de raisin (en russe). *Fiziol. Biokhim. Kult. Rast.* **5**, (2), 202-206.

Fédération Internationale des Producteurs de Jus de fruits. 1966. Détermination de la pectine. *Feuillet vert O.I.V.*, n° 194 (février).

FILIPPOVA T. V., 1971. Variation des teneurs des différents polyosides au cours de la maturation du raisin (en russe). *Uglebody Sel. Khoz. Rast.* 20-7, in *Chem. Abstr.* 77, 16640 j.

FILIPPOVA T. V., SHKOLENKO G. A., 1968. Spectre infra rouge de pectines de betterave à sucre et de raisin (en russe). *Fiziol. Biokhim. Kult. Rast.*, **4**, 65-70.

GAILLARD M., 1976. Étude sur les colloïdes glucidiques et la filtrabilité des vins. *Mémoire de fin d'étude ENITA, Bordeaux.*

GAIVORONSKAYA Z. I., 1970. Modifications de la teneur en substances pectiques dans les baies de raisin pendant la maturation et la conservation (en russe). *Vinod vinograd. S.S.S.R.*, **30**, (8), 20-22.

GAIVORONSKAYA Z. I., 1972. Modifications des substances colloïdales et de la viscosité du jus pendant la maturation et une longue conservation du raisin (en russe). *Vinod. vinograd. S.S.S.R.*, **32**, (3), 28-29.

HOPKINS E. F., GOURLEY J. H., 1930. Nitrogen fertilization and pectic materials in grape. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **95**, 158-162.

ISHERWOOD F. A., 1970. Hexosans, pentosans and gums; in HULME AC. *The biochemistry of fruits and their products*, **1**, 33-53. Academic Press. London, New-York.

KERTESZ Z. I., 1951. *The pectic substances*. 6, 8. Interscience ed. New York, London.

KISCHKOVSKY Z. N., SKOURIKHIN I. M., 1976. *Chimie du vin* (en russe), 5-29, Pichtchev prom Ed. Moscou.

LABORDE J., 1907. *Cours d'œnologie*. Mulo. Paris.

LAPSKER Z. I., BALTAGA S. V., TROFIMENKO N. M., 1970. Substances pectiques du raisin (en russe). *Sadovod. Vinograd. vinod. Moldav.*, **25**, (5), 25-26.

LINEVITCH L. I., 1965. *Polyosides* (en russe); in Petite encyclopédie chimique, 71, 203-203, Moscou Enc. Sov. Ed.

MARSH A., BONEVA, 1952. Recherche sur les colloïdes du jus de raisin (en russe). *Vinod. vinograd. S.S.S.R.*, 9, 14.

MARTEAU G., 1967. Les enzymes pectolytiques et la technologie du raisin et de la pomme. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **21**, (5), 223-245.

MARTEAU G., SCHEUR J., OLIVIERI C., 1961. Le rôle des enzymes pectolytiques du raisin ou des préparations commerciales dans les processus de clarification du jus. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 155-176.

MEHLITZ A., 1933. Konserven-Ztg 20, 113 cité par KERTESZ Z. I., 1951. *The pectic substances*. Interscience Publ. Inc. New York, 628.

MEKHUZLA N., 1977. Les colloïdes du vin. *Bull. O.I.V.*, **50** (552), 120-127.

MEURENS M., 1978. Les substances pectiques dans la technologie des jus de pommes. *Rev. Ferm. Indus. Alim.*, **33**, (1), 3-13.

MEURENS M., VANBELLE M., 1972. Biogénèse et dégradation enzymatique des substances pectiques. *Rev. Ferm. Indus. Alim.*, **27**, (3), 107-118.

MIHALCA G., SEGAL B., SEGAL R., 1977. Corrélation entre les caractéristiques biochimiques et la capacité de conservation de quelques variétés de raisin de table. in *Le raisin de table et le froid*. Institut International du froid et Office International de la Vigne et du Vin, Paris, 143-157.

MILOVANOVA L. V., BONDARENKO S. G., GRAMATSKAYA T. A., 1967. Actions des engrais et de la charge sur le complexe polyosidique des baies de raisin (en russe). *Sadovod. vinograd. vinod. mold.*, **2**, 22-25.

MINTCHOUK F. L., ZINTCHENKO V. I., KROKHMALUK V. V., 1975. Chromatographie en phase gazeuse des polyosides hydrosolubles du moût et du vin (en russe). *Izvest. vyssch. outcheb. Zaved. Picht. tekhnol.* **4**, 154-156.

MONTANT D., THOMAS L., 1977. Structure d'un glucane exocellulaire produit par le *Botrytis cinerea*. *Ann. Sci. Natur. Bot.*, **18**, 185-191.

MUNTZ A., LAINÉ E., 1906. Les matières pectiques dans le raisin et leur rôle dans la qualité des vins. *Ann. Brass. Dist.*, **9**, 157-173.

NAZAROVA A., 1957. Dosage des colloïdes dans les jus de raisin (en russe). *Konserv. i ovochtchesonsch. prom.* **12**, (6), 42 (d'après Chem. Abstr., 1958, 52, 607 g).

NETCHAEV L. N., 1947. Méthode de dosage des colloïdes dans le vin et dans le jus (en russe). *Vinod. vinograd. S.S.S.R.*, 1.

NILOV V. F., SKOURIKIN I. M., 1967. *Chimie de la vinification*. Pichtchev. prom., Ed. Moscou.

PEYNAUD E., 1951. Sur les matières pectiques des fruits. *Ind. Agr. Alim.*, **68**, (11-12), 609-615.

PEYNAUD E., 1952. Sur les matières pectiques des moûts de raisin et des vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **45**, 11-20.

PILNIK W., VORAGEN A. G. J., 1970. Pectic substances and other uronides; in HULME A. C., *The biochemistry of fruits and their products*, **1**, 53-87. Academic Press London, New York.

ROUSE A. H., KNORR L. C., 1969. Seasonnal changes in pectinesterase activity, pectins and citric acid of floride lemons. *Food Technol.*, **23**, (6), 121-123.

SALGUES M., 1977. Étude préliminaire d'un fractionnement des polyssacharides du vin. *DEA de Sciences Alimentaires. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.*

SEMICHON L., FLANZY M., 1926. Sur les pectines des raisins et le moelleux des vins. *C.R. Acad. Sci.*, **183**, 394.

SEMICHON L., FLANZY M., 1927. Sur la constitution et le dosage des pectines et des gommes dans le vin et le moût de raisin. *Ann. Fals. Fraudes.* **20**, 395-399.

SMIT C. J. B., COUVILLON G. A., 1971. The effect of the modified Munson and 4 arm kniffin training systems on changes in pectic substances of « Concord » grapes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **96**, (5), 547-549.

SOLMS J., BUCHI W., DEUEL H., 1952. Untersuchungen uber deir Pektingehalt einiger traubenmaste. *Mitt. Gerbr. Lebens. Hyg.*, **43**, 303.

SWIFT J. G BUTTROSE M. S., PASSINGHAM J. V., 1973. Stomata and starch in grape berries. *Vitis.*, **12**, 38-45.

TARANTOLA C., USSEGLIO-TOMASSET L., 1963*a*. I colloïdi delle uve e dei vini. *Riv. Vitic. Enol.*, **16**, 449-463.

TARANTOLA C., USSEGLIO-TOMASSET L., 1963*b*. La pectinmetilesterasi nelle uve: sua ripartizione nell'acino ed evoluzione nella vinificazione. *Att. Acc. It. Vite Vino.*, **15**, 209-224.

TYURINA S. S., 1977. Propriétés de la polygalacturonase du raisin (en russe). *Priklad. Biokh. Mikrob.*, **13**, (2), 189-193.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1976. Les colloïdes glucidiques solubles des moûts et des vins. *Conn. Vigne Vin.*, (2), 193-226.

USSEGLIO-TOMASSET L., AMERIO G., 1978. Pentosi, ramnosio egalattosio nei vini secchi. *Vini Ital.*, **20**, 112, 27-33.

USSEGLIO-TOMASSET L., CASTINO M., 1975. I colloïdi solubili di natura glucidica dei mosti e dei vini. *Riv. Vitic. Enol.*, **28**, (8), 328-339; (9) 374-391; (10) 401-412.

USSEGLIO-TOMASSET L., GABRI G., 1975. Gli acidi uronici nei mosti e nei vini. *Att. Acc. It. della Vite e del vino.*, **27**, 281-302.

ZINTCHENKO V. I., ALEKSEITCHOUK V. D., 1969. Polyosides hydrosolubles des baies de raisin (en russe). *Vinod. Vinograd. S.S.S.R.*, **29**, 10-12.

ZINTCHENKO V. I., ALEKSEITCHOUK V. D., 1975. Réserve technologique des polyosides hydrosolubles dans les raisins (en russe). *Sadovod. Vinograd. vinod. Mold.*, **30**, (8), 29-32.

ZINCHENKO V. I., ALEKSEICHUK I. G., YAZLOVETSKY, 1970. Isolation et purification des polyosides solubles des moûts (en russe). *Priklad. biokh. Mikrol.*, **5**, 583-585.

ZINTCHENKO V. I., GRAMATSKAYA T. A., 1971. Isolation des hémicelluloses des baies solubles dans les solutions alcalines (en russe). *Izvest. Vyssch. Ucheb. Zoved. Pisch. Tekhnol.*, **1**, 47-49.

ZINTCHENKO V. I., GRAMATSKAYA T. A., KESHISHEVA G. M., 1975. Caractérisation comparative des différentes fractions de polyosides en fonction de l'extraction (en russe). *Priklad. Biokh. Mikrob.*, **11**, (4), 613-618.

ZINTCHENKO V. I., GRAMATSKAYA T. A., KESHISHEVA G. M., IAZLOVETSKY I. G., 1975. *Rec. problèmes de la bioch. du raisin et du vin* (en russe), 88, Pichtchev prom., ed. Moscou.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (1), 151.

## Chronique des Livres

# Journées d'étude micro-ondes et produits alimentaires

*La remise en température des produits surgelés et réfrigérés*

*Lyon, 15 et 16 mai 1979, Session de Formation Continue*

L'Université Claude-Bernard, Lyon I, Département HF et Micro-Ondes (*) et l'ADITEC (**) organisent les 15 et 16 mai 1979, à l'Université, deux Journées d'Étude sur la remise en température par Micro-Ondes des produits surgelés et réfrigérés.

Les thèmes suivants seront notamment traités au cours de ce Colloque :

— Évolution des mœurs dans l'alimentation domestique et collective.
— La réfrigération et la surgélation.
— La décongélation : mécanismes, normes, bactériologie.
— Généralités sur les ondes électromagnétiques.
— Les fours à micro-ondes.
— Exemples de réalisations pour la restauration collective.
— Exemples de réalisations pour la restauration commerciale.
— Exemples de réalisations pour les applications domestiques.
— Technologie de la préparation et du conditionnement des plats cuisinés surgelés et réfrigérés en vue de la remise en température par micro-ondes.
— Décongélation des grosses masses : quartiers de viande, gros poissons.
— Autres applications des micro-ondes dans l'industrie alimentaire.

Les conférences seront présentées par des spécialistes des questions traitées appartenant aux organisations professionnelles, à l'industrie, à l'Université, à des Instituts de Recherche et aux Centres Techniques des Industries Alimentaires.

Un Forum ouvert au grand public (exposés et débat, durée 2 h) permettra de donner une large information de caractère très général sur ces nouvelles techniques. Les participants se retrouveront ensuite autour d'un buffet où ils pourront déguster des produits remis en température par micro-ondes.

(*) *Université Claude-Bernard, Lyon I, Département HF et Micro-Ondes, 43, boulevard du 11-Novembre 1918, 69621 Villeurbanne.* Tél. ( : 78) 52-07-04, poste 30-88. (Organisateur du Colloque « les Applications Industrielles des HF et des Micro-Ondes », Lyon, 26-27 janvier 1977).

(**) *ADITEC : Association « Alimentation et Diététique, Technologie et Marketing », Institut Pasteur de Lyon*, 77, rue Pasteur, 69007 Lyon, Tél. : (78) 72-35-09 (Organisateur des Journées d'Étude « ADITEC 78 », Lyon, 20-21-22 septembre 1978, portant sur : L'évolution des facteurs socio-économiques et leurs conséquences sur l'alimentaire actuelle et future; la maîtrise et la promotion de la qualité, la commercialisation et la consommation des produits alimentaires).

# annales de technologie agricole

Trimestriel

1979

Vol. 28 - N° 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (2), 153-179.

# Étude biochimique et submicroscopique des gluténines

J. LEFEBVRE (*), Nicole CROZET, J. GUEGUEN (*)
V. SOUVANAVONG SIHARKAR (***) et L. PETIT (***)

Avec la collaboration technique de
M. AUTRAN, S. GOUGIS, A. KOZLOWSKI

(*) *Laboratoire de Biochimie des Aliments, I.N.R.A., Centre de Recherches de Nantes, 44072 Nantes Cedex*

(**) *Laboratoire de Physiologie de la reproduction, Centre national de Recherches zootechniques, I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas*

(***) *Laboratoire de Technologie des Aliments, I.N.R.A. 91305 Massy*

## Résumé

Le résidu du gluten insoluble dans le dioxanne à 40 p. 100, qui regroupe la majeure partie des gluténines, peut être fractionné par extraction par l'acide acétique 0,01 N en une fraction soluble $A_n$ et une fraction insoluble $B_n$.

Pour étudier la double hétérogénéité, biochimique et submicroscopique, de $A_n$ et $B_n$, nous avons fractionné ces protéines, après réduction et alkylation, par tamisage moléculaire et chromatographie d'échange d'ions. Les fractions obtenues sont caractérisées par leurs diagrammes électrophorétiques, leurs compositions en acides aminés et leurs aspects submicroscopiques (microscope électronique à transmission).

Nous avons cherché à tenir compte des relations des constituants protéiques avec les lipides et les acides nucléiques.

Les fractionnements de $A_n$ et $B_n$ réduites et alkylées, permettent de séparer une fraction riche en acide nucléique de plusieurs fractions de nature protéique. On peut distinguer dans les sous-unités protéiques constitutives de ces fractions deux types principaux de chaînes polypeptidiques. Le premier s'apparente aux gliadines. Le second rassemble des sous-unités de composition en acides aminés proche de celle des albumines-globulines et dont certaines présentent une structure submicroscopique qui semble indiquer qu'elles sont associées à des substances non protéiques issues des structures cellulaires, que l'on peut observer dans le cas de $B_n$ à l'état natif.

A partir de ces résultats les auteurs formulent l'hypothèse que « les gluténines » regroupent deux types de protéines de nature très différente :

— Les unes qui, avec les gliadines dont elles ne diffèrent que par le caractère intercaténaire de leurs ponts disulfures, pourraient constituer une famille « de protéines de réserve » caractéristique des céréales.

— Les autres qui correspondent probablement à des protéines ayant un rôle fonctionnel ou structural dans la cellule.

Mots clés : *gluténines, hétérogénéité, structure, fractionnement, microscopie électronique.*

## Introduction

La classification des protéines du gluten est fondée sur des différences de solubilité dans des solvants empiriquement choisis. Elle ne rend pas compte de l'hétérogénéité biochimique de chacune des familles de protéines ainsi définies. Aussi il nous a semblé intéressant d'essayer de classer les protéines du gluten sur des bases biophysico-chimiques plus larges que les différences de solubilité et de tenter de corréler l'hétérogénéité biochimique des gliadines et des gluténines avec différents types de structure observées en microscopie électronique.

Quelques études ont déjà été orientées dans ce sens. Ainsi SIMMONDS (1972*a*), CROZET *et al.* (1974) attribuent aux gliadines une structure submicroscopique homogène et montrent que les gluténines présentent par contre une structure très hétérogène essentiellement granulaire et fibrillaire. Les travaux de ORTH *et al.* (1973) soulignent également cette hétérogénéité. La gluténine apparaît constituée de filaments et de disques reliés entre eux. Dans notre étude nous avons poursuivi ces travaux en essayant tout particulièrement d'apporter une explication à cette hétérogénéité submicroscopique des gluténines. Notre idée directrice a été de distinguer dans cette classe protéique les divers types de sous-unités qui la constituent et d'expliquer leurs différences de structure observée par microscopie électronique, à la lumière de leurs caractéristiques physico-chimiques.

## Matériel et méthodes

### *Matériel*

Le gluten utilisé est un gluten industriel « vital » de blé tendre; ce gluten ne semble pas avoir subi de dénaturation appréciable car il présente des caractéristiques de solubilité et des propriétés rhéologiques similaires à celles des glutens préparés au laboratoire par lixiviation manuelle.

Sa teneur en azote est de 14,75 g pour 100 g de matière sèche.

### *Méthodes*

Les diverses fractions protéiques du gluten sont séparées par différence de solubilité suivant le diagramme de la figure 1. Les gliadines, les albumines et les globulines sont extraites du gluten par une solution-eau dioxanne à 40 p. 100 de dioxanne. Le résidu qui contient les gluténines est fractionné, après lyophilisation, par extraction dans l'acide acétique 0,01 N en 2 fractions $A_n$ et $B_n$, respectivement soluble et insoluble dans ce solvant. $A_n$ et $B_n$ sont étudiées après réduction de leurs ponts disulfures; elles sont alors appelées A et B pour éviter toute confusion. Avant réduction, $B_n$ doit être délipidée afin d'améliorer sa solubilité dans les tampons utilisés au cours de l'étude.

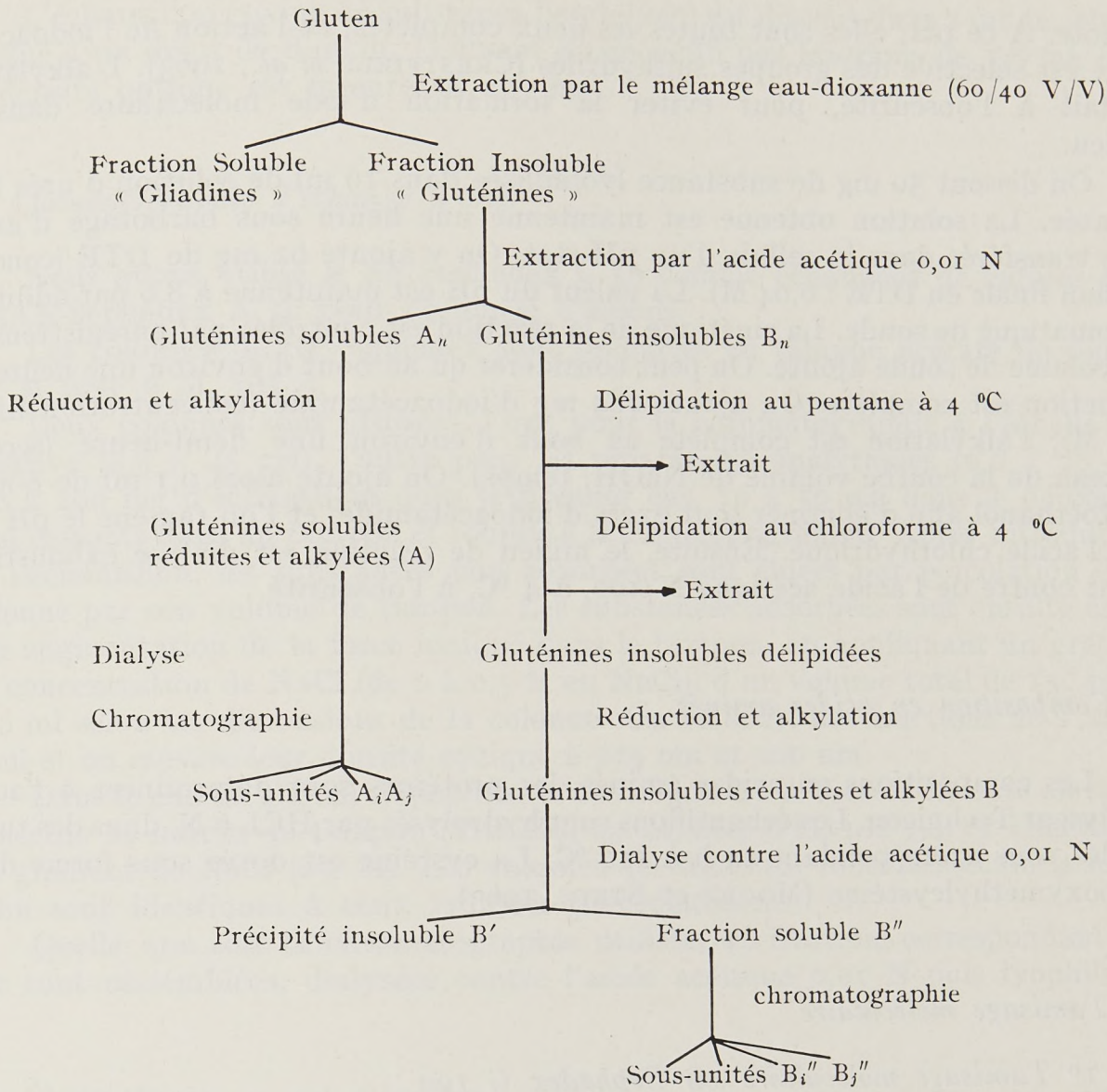



FIG. 1. — *Protocole expérimental de préparation des diverses fractions protéiques étudiées.*

A) *Extractions et délipidations*

Qu'il s'agisse d'extraction ou de délipidation, ces opérations sont effectuées sur agitateur rotatif à 4 °C pendant une nuit. Le rapport substance/solvant est dans tous les cas de 30 mg de produit sec par ml. Après extraction la suspension est centrifugée (20 mn à 8 500 t/mn) et le résidu insoluble rincé trois fois par le solvant. L'emploi du dioxanne et de l'acide acétique 0,01 N comme agents d'extraction permet de lyophiliser les surnageants et les résidus sans dialyse préalable. Dans le cas des délipidations, les fractions solubles et insolubles sont séchées par évaporation à froid du solvant résiduel. On utilise comme solvants de délipidation successivement le pentane et le chloroforme.

B) *Réduction et alkylation des fractions A et B*

Après réduction des ponts S-S par action du dithioérythritol (DTE) (CLELAND, 1964), les groupes SH sont alkylés par réaction avec l'iodoacétamide (CRESTFIELD *et al.*, 1963). Les deux réactions se font en milieu urée 8 M, à pH 8,6, sous courant

d'azote. A ce pH, elles sont toutes les deux complètes, et l'action de l'iodoacétamide est sélective des groupes sulfhydriles (CRESTFIELD *et al.*, 1963). L'alkylation se fait à l'obscurité, pour éviter la formation d'iode moléculaire dans le milieu.

On dissout 50 mg de substance lyophilisée dans 10 ml de solution d'urée 8 M dégazée. La solution obtenue est maintenue une heure sous barbotage d'azote puis transférée dans la cellule d'un pH-stat. On y ajoute 62 mg de DTE (concentration finale en DTE : 0,04 M). La valeur du pH est maintenue à 8,6 par addition automatique de soude. La cinétique de la réaction est contrôlée par enregistrement du volume de soude ajouté. On peut considérer qu'au bout d'environ une heure, la réduction est complète. On ajoute 184 mg d'iodoacétamide (concentration finale 0,1 M); l'alkylation est complète au bout d'environ une demi-heure (second plateau de la courbe volume de NaOH, temps). On ajoute alors 0,1 ml de β-mercaptoéthanol afin d'éliminer tout excès d'iodoacétamide, et l'on ramène le pH à 3 par l'acide chlorhydrique. Ensuite, le milieu de réaction est dialysé exhaustivement contre de l'acide acétique N/100, à 4 °C, à l'obscurité.

C) *Composition en acides aminés*

Les compositions en acides aminés des protéines sont déterminées à l'autoanalyseur Technicon. Les échantillons sont hydrolysés par HCL 6 N, dans des tubes scellés, sous azote, pendant 24 h à 110 °C. La cystéine est dosée sous forme de S carboxymethylcystéine (MOORE et STEIN, 1963).

D) *Tamisage moléculaire*

1° *Tamisage moléculaire sur Sephadex G 100*

On utilise comme solvant le tampon lactate d'aluminium, pH 3,5 0,018 N en acide lactique, 0,02 M en lactate. La colonne a pour dimensions 2,5 × 100 cm. Le volume d'exclusion ($V_0$ = 180 ml) et le volume total du gel ($V_t$ = 480 ml) sont mesurés par les volumes d'élution du bleu de dextrane et du glycocolle respectivement.

On introduit 100 mg d'échantillon en solution dans 4 ml de tampon. L'élution se fait au débit de 14 ml/h et l'éluant est recueilli par fractions de 3 ml dont la densité optique est lue à 275 nm.

2° *Tamisage moléculaire sur billes de verre poreuses*

Le diamètre moyen des pores des billes de verre poreuses Corning CPG 10 utilisées est de 240 Å. La colonne a un diamètre de 1,7 cm et la hauteur occupée par le tamis moléculaire est de 75 cm. Le volume mort et le volume accessible total, déterminés comme décrit ci-dessus sont d'environ 65 ml et 140 ml respectivement. Le domaine de fractionnement de ce support correspond approximativement à celui du Sephadex G 100.

Le solvant utilisé est un mélange dioxanne-eau 40/60 (V/V) contenant du KCl à la concentration de 0,25 M. Ce solvant empêche l'adsorption des protéines sur le verre poreux, qui se produit en milieu aqueux. La récupération des protéines, dosées par la méthode de LOWRY *et al.* (1951), est pratiquement totale.

L'échantillon (50 mg de substance lyophilisée) est dissout dans 2 ml de solvant et élué à un débit de 8 ml/h; l'effluent est recueilli par fractions de 1,8 ml, dont la densité optique est mesurée à 275 nm.

E) *Chromatographie d'échange d'ions*

Nous avons utilisé le SP-Sephadex C 50 comme échangeur de cations et le DEAE-Sephadex A 50 pour l'échange d'anions.

Les colonnes de SP-Sephadex sont préparées en tampon acétate de sodium 0,1 M urée 6 M, pH 5.

Deux colonnes sont utilisées, l'une pour la chromatographie à l'échelle préparative (2,5 × 45 cm), l'autre pour les séparations analytiques (0,6 × 70 cm). 100 à 200 mg d'échantillon dans le premier cas, 10 à 50 mg dans le deuxième, sont dissouts dans du tampon et soumis à la chromatographie. Après introduction de l'échantillon, les substances non adsorbées sont éluées par percolation de la colonne par son volume de tampon. Les substances adsorbées sont ensuite éluées par augmentation de la force ionique dans le tampon, en appliquant un gradient de concentration de NaCl (de 0 à 0,5 M en NaCl), d'un volume total de 150 ml ou 400 ml selon les dimensions de la colonne. On recueille des fractions de 1 ml ou 3 ml et on mesure leur densité optique à 275 nm et 260 nm.

Dans le cas du DEAE-Sephadex, la technique est la même, excepté en ce qui concerne la nature du tampon (Tris HCl 0,1 M, urée 6 M, pH 7,6) et l'amplitude du gradient de NaCl (0-1 M). Les volumes des fractions collectées et du gradient salin sont identiques à ceux indiqués précédemment.

Quelle que soit la chromatographie utilisée, les fractions correspondant à un pic sont rassemblées, dialysées contre l'acide acétique 0,01 N puis lyophilisées.

F) *Électrophorèse en gel d'amidon*

L'électrophorèse en gel d'amidon (Woychik *et al.*, 1961) est pratiquée en tampon lactate d'aluminium pH 3,2 ($1{,}51\ 10^{-3}$ M en lactate, 0,052 M en acide lactique, 3 M en urée).

La migration se poursuit 5 heures sous un champ de 10 Volts/cm et une densité de courant de 2,5 mA/cm$^2$. Les gels sont colorés par la nigrosine (500 mg/l) en milieu acide acétique à 50 p. 100 contenant 750 mg/l d'EDTA.

G) *Dosage d'azote*

L'azote est dosé par la microméthode de Kjeldahl.

H) *Dosage des protéines*

La concentration en protéines des fractions obtenues par tamisage moléculaire et chromatographie d'échange d'ions, est déterminée à l'aide de la méthode de Lowry *et al.* (1951); mais les prises d'échantillon et les volumes de réactifs sont divisés par 4 par rapport à la technique originale. L'étalonnage se fait avec des solutions de sérum albumine de Bœuf (Fraction V de Cohn) Sigma.

I) *Détermination de la teneur en matière sèche*

La teneur en matière sèche des produits lyophilisés et des solutions est déterminée par séchage à l'étuve à 102° jusqu'à poids constant.

J) *Dosage des lipides totaux*

La méthode de DRAPRON (1975) est utilisée pour le dosage des lipides totaux.

Les lipides sont libérés par une hydrolyse acide en présence d'éthanol et d'acide formique. Le formiate d'éthyle formé *in situ* dissout les lipides, et ceux-ci sont ensuite extraits par l'hexane. La teneur en lipides est obtenue par pesée de l'extrait après évaporation de l'hexane.

K) *Préparation des échantillons pour l'observation au microscope électronique par transmission*

Les fractions lyophilisées sont fixées par une solution de formol à 15 p. 100 tamponnée à pH 7, pendant une heure à température ambiante.

Elles sont post-fixées par une solution de tétroxyde d'osmium à 1 p. 100 dans le même tampon, pendant 30 minutes, à température ambiante.

Le matériel est ensuite déshydraté par de l'éthanol et inclus dans un mélange de méthyl et de butyl métacrylate. Les coupes minces obtenues après polymérisation sont observées à l'aide d'un microscope électronique Siemens Elmiskop I.

## Résultats

### I. — *Composition biochimique globale et structure submicroscopique des gluténines solubles ($A_n$) et insolubles ($B_n$) dans l'acide acétique 0,01 N*

Le tableau 1 donne la composition globale des fractions $A_n$ et $B_n$ comparée à celle du gluten total et à celles des gluténines totales, insolubles dans le dioxanne à 40 p. 100. Ces résultats montrent qu'au cours des extractions successives les résidus s'enrichissent en lipides, mais que les gluténines $A_n$ solubles dans l'acide acétique en paraissent dépourvues. Comme par ailleurs la teneur en azote de cette fraction est plus faible, il s'y concentre vraisemblablement une partie importante des glucides du gluten, soit sous forme de glycoprotéines, soit sous forme de pentosanes solubles dans l'acide acétique dilué.

Si l'on compare la teneur en protéines des fractions calculée d'après la teneur en azote à celle obtenue à partir des déterminations de composition en acides aminés, on note que l'azote contenu dans $A_n$ semble exclusivement de nature protéique.

Ces bilans indiquent au contraire que les gluténines $B_n$ insolubles dans l'acide acétique contiennent seulement 60 p. 100 de protéines environ, contre une teneur en azote × 5,7 de 85,6 p. 100; cette fraction inclut donc une proportion impor-

TABLEAU I

*Composition globale des fractions gluténines solubles* ($A_n$) *et gluténines insolubles* ($B_n$) *comparée à celle du gluten total*

| | m.s. en p. 100 de la m.s. du gluten (1) | N × 5,7 p. 100 de m.s. | N en p. 100 de l'azote du gluten | Protéines en m.s. (2) | Protéines en p. 100 des protéines du gluten (2) | Lipides totaux en p. 100 m.s. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gluten . . . . . | 100 | 84 | 100 | 74,9 | 100 | 5,5 |
| Résidu insoluble dans le dioxanne à 40 p. 100 | 43 | 82,5 | 42,2 | 63,5 | 36,5 | 6,4 |
| *dont :* | | | | | | |
| Fraction $A_n$ . . | 12 (3) | 74,1 | 10,6 | 75 | 12 | 0 (3) |
| Fraction $B_n$ . . | 31 | 85,6 | 31,6 | 57,8 | 23,9 | 9,1 |

(1) m.s. : matière sèche.

(2) Les teneurs en protéines sont calculées à partir des résultats des analyses de composition en acides aminés.

(3) Valeur obtenue par différence.

tante d'azote non protéique. Nous montrerons d'ailleurs ultérieurement que $B_n$ contient des composants nucléiques, et de plus que l'examen au microscope électronique permet de reconnaître des fragments membranaires et des structures de type « reticulum endoplasmique »

La composition en acides aminés de $A_n$ et de $B_n$ est donnée dans le tableau 2 en comparaison avec les résultats obtenus par différents auteurs pour les gluténines solubles et insolubles dans l'acide acétique dilué. Le caractère le plus marquant de ces résultats est leur grande dissemblance d'un auteur à un autre. Ces écarts reflètent des différences dans la nature des protéines analysées dues essentiellement à des différences dans les processus de préparation des « gluténines solubles » et des « gluténines insolubles » qui font que ces fractions ne regroupent pas en fait les mêmes constituants protéiques dans les mêmes proportions. Dans ces conditions, il est difficile évidemment de confronter les analyses obtenues par des chercheurs différents. C'est une difficulté que nous rencontrerons tout au long de cette étude. Quoi qu'il en soit, il semble que notre fraction $A_n$ par sa composition en acides aminés est assez proche des gluténines solubles d'Ewart (1968) et $B_n$ des gluténines insolubles de Godon (1969). Les différences principales entre $A_n$ et $B_n$ sont que $B_n$ contient une quantité plus importante d'alanine, de lysine et d'acide aspartique, alors que $A_n$ contient plus de cystéine et de proline. Dans l'ensemble, $A_n$ ressemble un peu plus que $B\hat{o}$ à la fraction du gluten soluble dans le dioxanne à 40 p. 100 (tabl. 2). Cependant $A_n$ et $B_n$, bien qu'elles aient des caractères de solubilité différents, ont une composition en acides aminés voisine ; ceci peut paraître paradoxal car on connaît l'incidence importante de cette composition sur la solubilité. Il est

TABLEAU 2

*Compositions en acides aminés* (1) *des fractions* $A_n$ *et* $B_n$ *comparées d'une part à quelques données de la littérature sur la composition des gluténines solubles et des gluténines insolubles dans l'acide acétique dilué, d'autre part à la composition de la fraction gliadine extraite par le mélange eau-dioxanne* (60/40 *V/V*)

| | Fraction soluble dans le dioxanne 40 p. 100 | Gluténines solubles | | | | Gluténines insolubles | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $A_n$ | Ewart (1968) | Crow et Rothfus (1968) | Huebner *et al.* (1974*a*) | $B_n$ | Godon (1969) | Cluskey et Dimler (1967) |
| Asp. . | 23 | 31 | 37 | 17 | 27 | 43 | 51 | 70 |
| Thr. . | 21 | 31 | 32 | 23 | 32 | 39 | 35 | 50 |
| Ser. . | 47,8 | 63 | 65 | 54 | 74 | 61 | 64 | 60 |
| Glu. . | 384 | 325 | 300 | 269 | 333 | 261 | 244 | 170 |
| Pro. . | 163 | 132 | 117 | 106 | 130 | 109 | 98 | 60 |
| Gly. . | 41 | 66 | 71 | 67 | 84 | 71 | 72 | 90 |
| Ala. . | 39 | 37 | 41 | 26 | 34 | 59 | 64 | 80 |
| Val. . | 43 | 47 | 48 | 26 | 40 | 53 | 54 | 70 |
| Cys. . | 13 | 21 | 25 | 12 | 18 | 17 | 26 | 10 |
| Met. . | 6 | 12 | 14 | 10 | 14 | 17 | 16 | — |
| Ile . . | 40 | 36 | 37 | 21 | 30 | 41 | 49 | 50 |
| Leu. . | 70 | 72 | 65 | 48 | 65 | 71 | 71 | 90 |
| Tyr. . | 16 | 24 | 27 | 23 | 30 | 26 | 28 | 30 |
| Phe. . | 43 | 35 | 39 | 23 | 36 | 40 | 42 | 40 |
| Trp. . | — | — | 12 | — | 5 | — | — | — |
| Lys. . | 10 | 17 | 23 | 10 | 15 | 33 | 30 | 60 |
| His. . | 19 | 18 | 18 | 11 | 16 | 21 | 21 | 30 |
| Arg. . | 21 | 32 | 30 | 19 | 24 | 37 | 39 | 50 |

(1) Résultats exprimés en moles de chaque acide aminé pour 1 000 moles d'acides aminés totaux dosés.

probable que les constituants non protéiques présents dans $B_n$ confèrent à cette fraction son insolubilité.

L'hétérogénéité dans la composition globale de $A_n$ et de $B_n$ (tabl. 1) s'accompagne d'une hétérogénéité de structure révélée par l'observation au microscope électronique à transmission.

En effet, ces deux fractions présentent à la fois des zones d'aspect lisse (semblables à l'aspect des gliadines) et des zones granuleuses (fig. 2). Ces dernières pourraient correspondre soit à des constituants lipidiques et glucidiques libres, soit plutôt à des protéines associées avec ces constituants non protéiques. De plus, dans le cas des gluténines insolubles $B_n$, ont peut observer des gouttelettes de lipides libres.

A cette diversité des structures submicroscopiques correspond probablement une diversité dans les types des protéines. Aussi avons-nous essayé d'étudier les différentes sous-unités des gluténines réduites et alkylées A et B séparées par les méthodes classiques de fractionnement des protéines, en relation avec leur structure submicroscopique, dans le but d'obtenir quelques renseignements quant à l'origine histologique et le rôle fonctionnel ou de réserve de ces protéines.

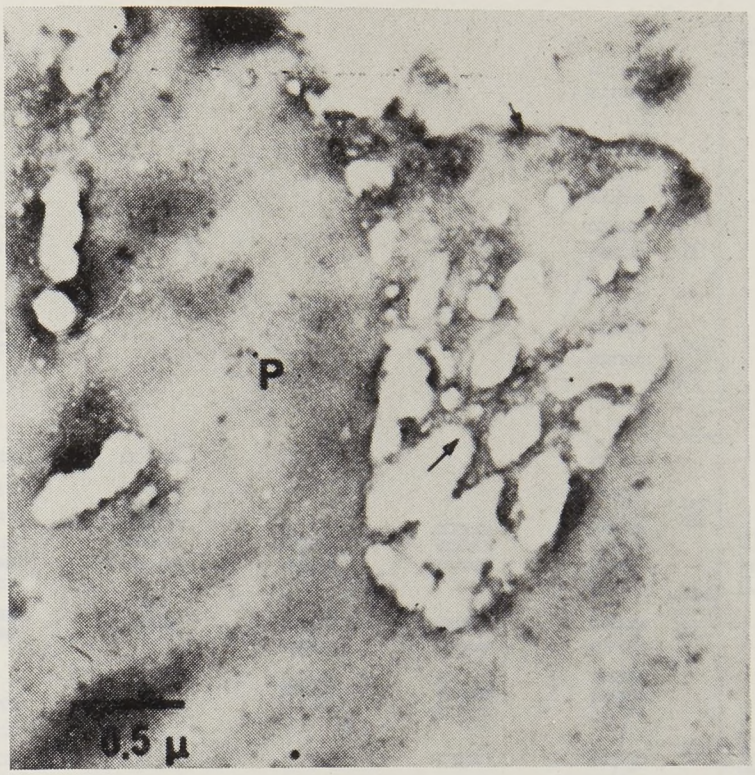



FIG. 2*a*.

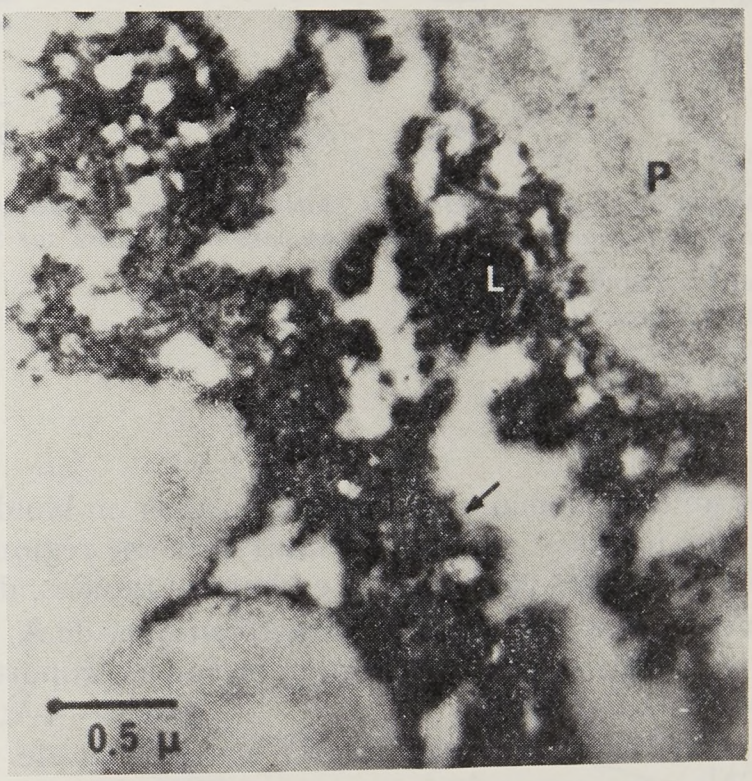



FIG. 2*b*.

FIG. 2. — *Structure submicroscopique des gluténines solubles* ($A_n$) *et insolubles* ($B_n$) *fixées par l'acide osmique* ($OsO_4$).

FIG. 2*a*. — $A_n$ *Fragments lisses et compacts* (P), *zone réticulée* (flèche).

FIG. 2*b*. — $B_n$ *Fragments compacts* (P), *zone fibrillaire* (flèche), *gouttelettes lipidiques* (L).

## II. — *Étude des gluténines solubles dans l'acide acétique réduites et alkylées* (*A*)

Après réduction des ponts disulfurés par le dithioerythritol et la carboxyméthylation par l'iodoacétamide des SH formés, A apparaît hétérogène en électrophorèse en gel d'amidon (fig. 3) : elle est résolue en de nombreuses bandes dont les

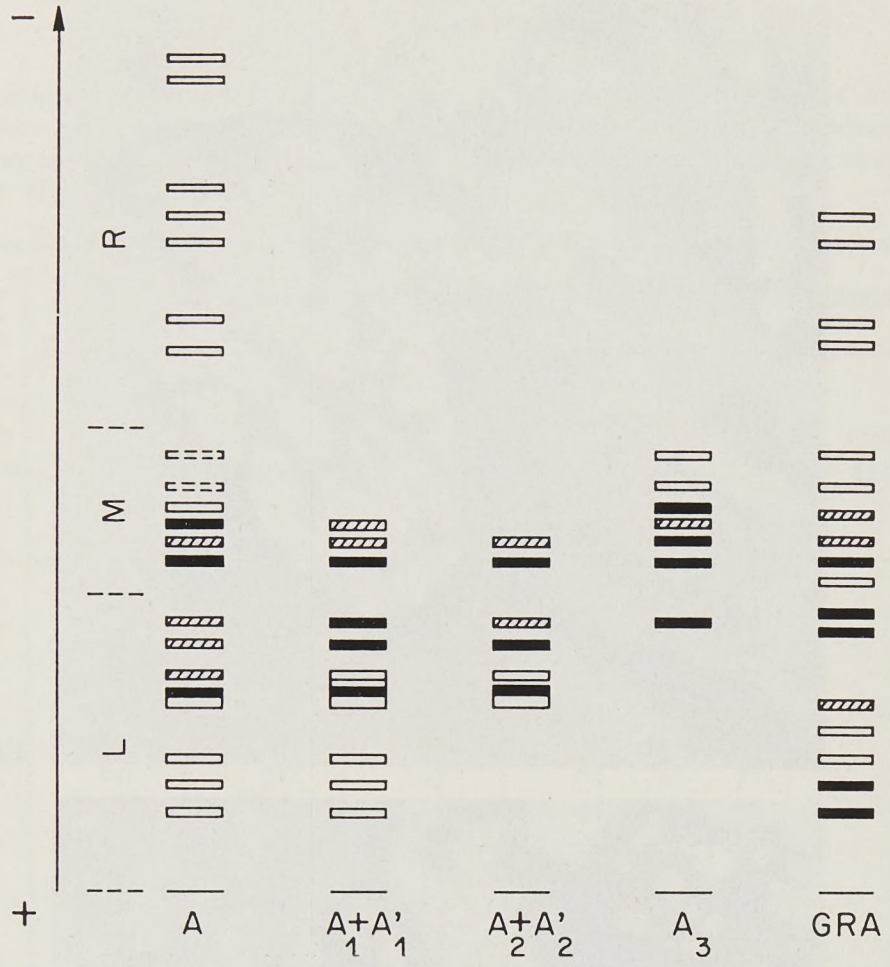



FIG. 3. — *Électrophorèse en gel d'amidon des gluténines solubles réduites et alkylées (A) et de leurs différentes fractions obtenues par tamisage moléculaire sur Sephadex G 100.*

GRA : gliadines réduites alkylées.
L : bandes lentes.
M : bandes moyennes.
R : bandes rapides.

mobilités couvrent un large domaine. On peut les classer en bandes lentes, les plus nombreuses et les plus intenses, qui migrent dans la même région que les gliadines réduites et alkylées, en bandes moyennes et en bandes rapides, de faible intensité.

Les composants moyens semblent être caractéristiques de A, parce que d'après les électrophorégrammes ils ne sont présents qu'en faible proportion dans les gliadines réduites et dans la fraction B.

Le tamisage moléculaire sur Sephadex G 100 permet de distinguer 3 pics (fig. 4) $A_1$, $A_2$ et $A_3$; nous avons également recueilli les fractions intermédiaires $A'_1$ et $A'_2$. L'électrophorèse (fig. 3) révèle que $A_1 + A'_1$ et $A_2 + A'_2$ correspondent principalement aux nombreux composants de faible mobilité évoqués plus haut. On peut remarquer que les pics $A_1$ et $A_2$, quoique bien séparés sont formés essentiellement de constituants électrophorétiques semblables. L'absence de bandes rapides sur les électrophorégrammes des fractions résulte probablement de la différence de concentration entre les échantillons déposés pour A d'une part et $A_1$, $A_2$, $A_3$ d'autre part. Le pic $A_3$ concentre les protéines de mobilité moyenne; certaines de ces bandes sont également présentes dans les fractions $A_1 + A'_1$ et $A_2 + A'_2$. Il s'agit peut être des mêmes protéines mais sous la forme d'aggrégats associés à du matériel non crotéique dans le cas du pic $A_1 + A'_1$ et à l'état plus ou moins dissocié dans le pas des pics $A_2 + A'_2$ et $A_3$.

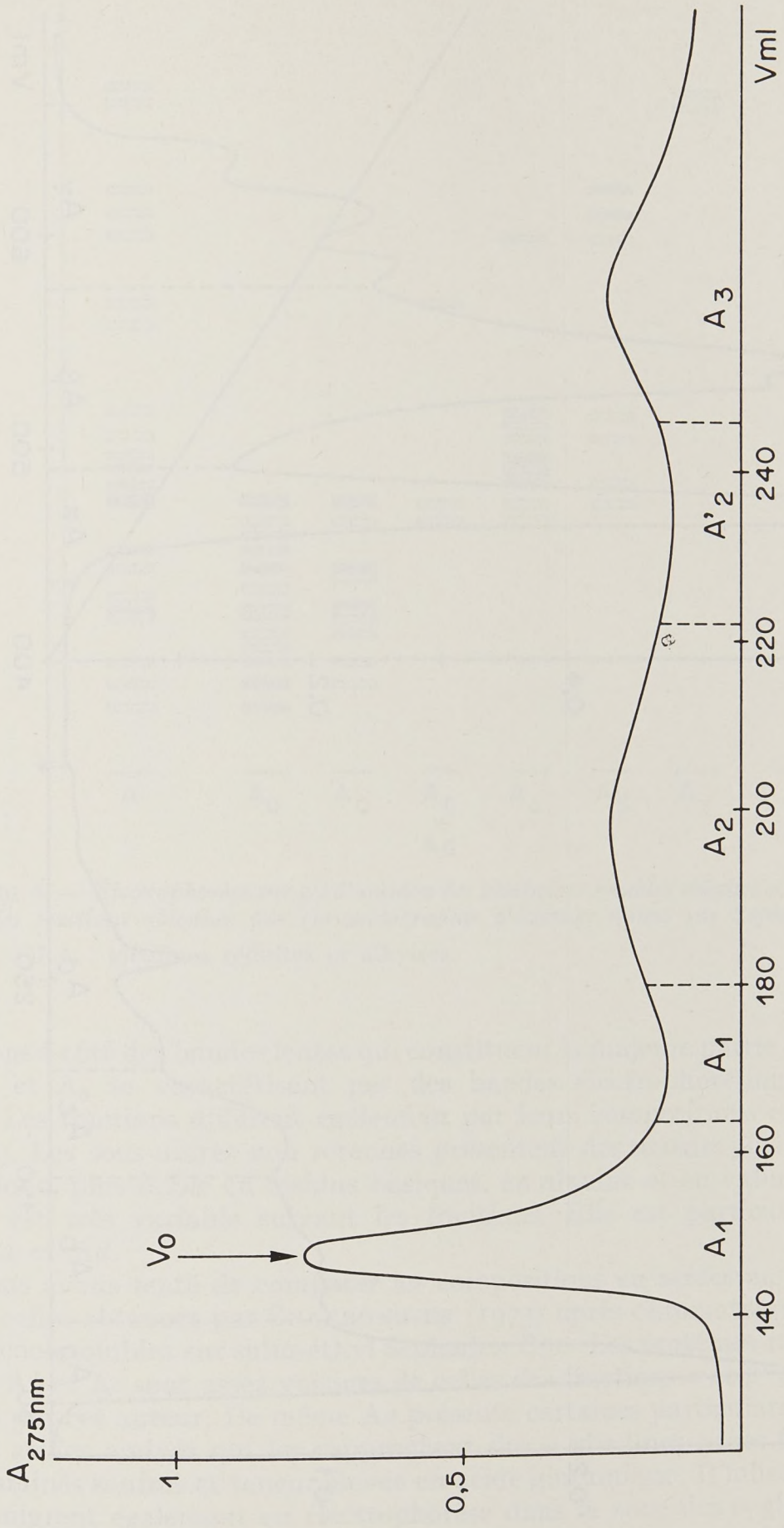



FIG. 4. — *Tamisage moléculaire sur Sephadex G 100 des gluténines solubles réduites et alkylées (A) en tampon lactate d'aluminium pH 3,5.*

Les constituants de $A_3$, qui ont un poids moléculaire plus faible que les composants lents, présentent aussi un caractère cationique plus marqué. Ils constituent une fraction particulière lors du fractionnement de A par chromatographie d'échange de cations sur SP Sephadex C50 (tampon acétate de sodium pH 5,0)

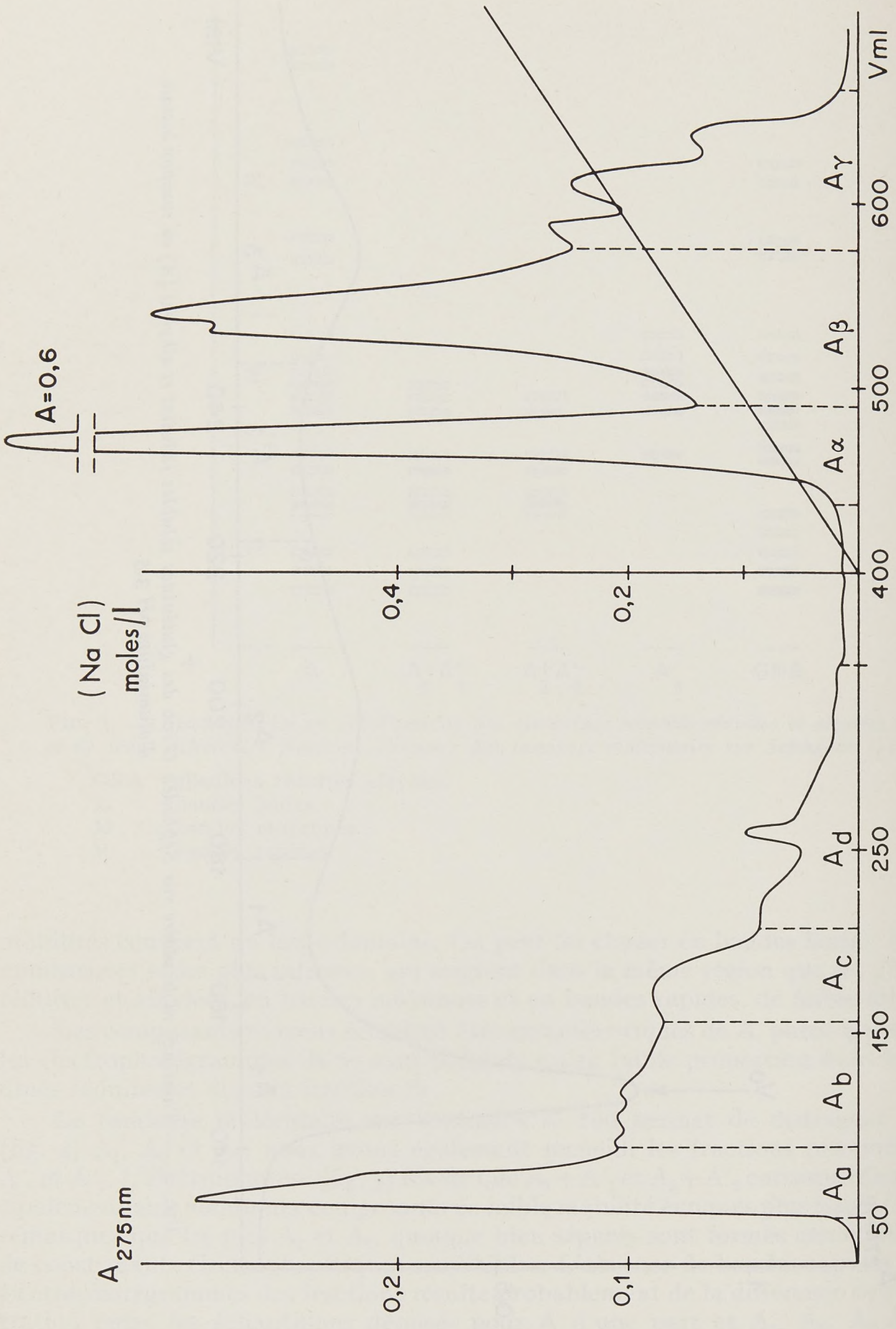



FIG. 5. — *Chromatographie d'échange de cations sur Sephadex SPC 50 des gluténines solubles réduites et alkylées (A).*
— Tampon acétate de sodium 0,1 M Urée 6 M (pH 5).

(fig. 5), il s'agit du pic $A_\alpha$ élué pour une concentration en NaCl voisine de 0,08 M. On retrouve en effet dans le diagramme électrophorétique de cette fraction les bandes principales de $A_3$ (fig. 6). Certaines des bandes de $A_\alpha$ sont aussi présentes sur le diagramme électrophorétique des fractions non retenues sur l'échangeur

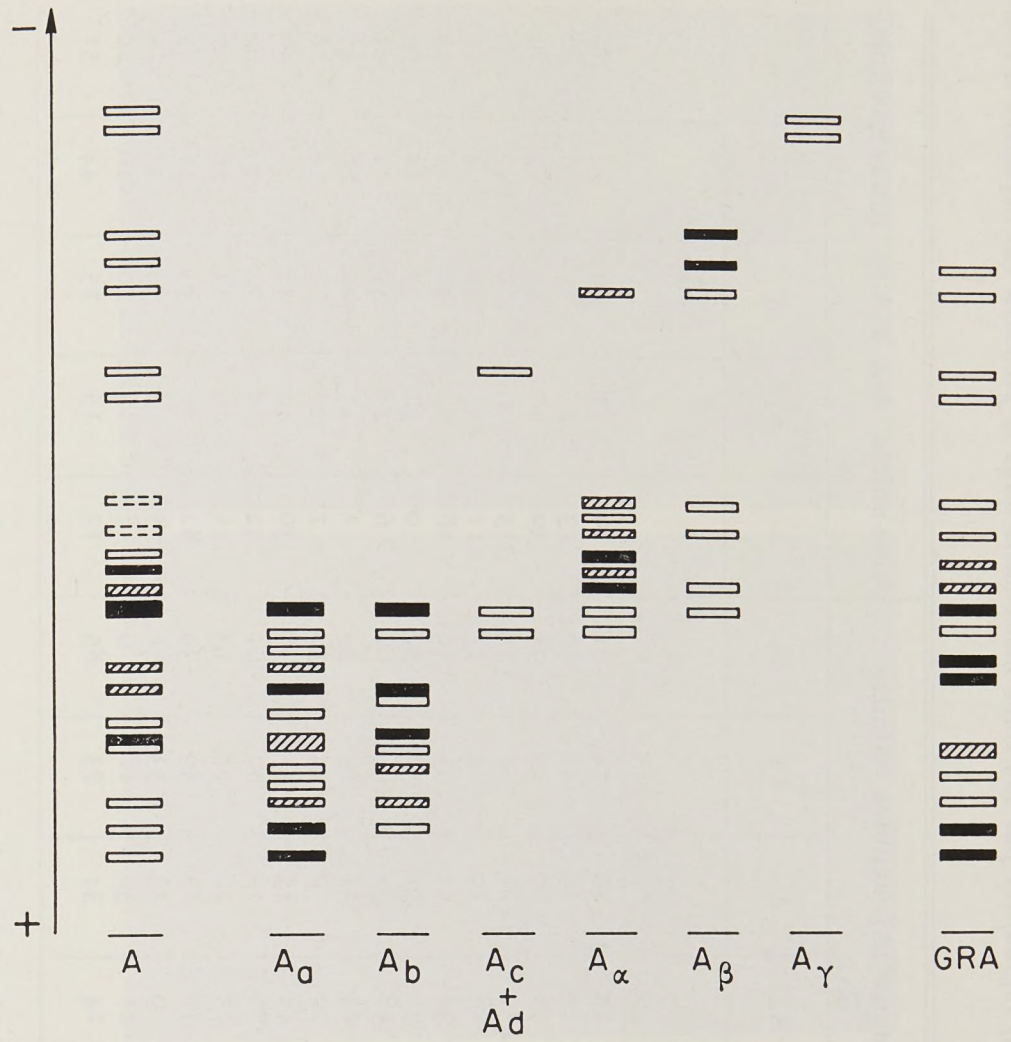



FIG. 6. — *Électrophorèse sur gel d'amidon des gluténines solubles réduites et alkylées (A) et des fractions obtenues par chromatographie d'échange d'ions sur Sephadex SPC50.*

GRA : gliadines réduites et alkylées.

de cations à côté des bandes lentes qui constituent la majeure partie de ces dernières.

$A_\gamma$ et $A_\beta$ se caractérisent par des bandes électrophorétiques de mobilité élevée. Les fractions diffèrent également par leurs compositions en acides aminés (tabl. 3). Les sous-unités non retenues présentent des teneurs plus élevées en acide glutamique, plus faible en résidus basiques, en alanine et en valine. La teneur en proline est très variable suivant les fractions. Elle est particulièrement faible pour A*a* et A*d*.

Nous avons tenté de comparer les compositions en acides aminés de ces fractions à celles obtenues par CHARBONNIER (1973) après chromatographie des gluténines alcoolosolubles sur sulfo-éthyl Sephadex C50. Les protéines rassemblées dans les pics A*b* et A*c* sont assez voisines de celles des fractions α et β′ de type gliadine définies par cet auteur. De même A*a* présente certaines particularités de composition en acides aminés qui les rapprochent des ω gliadines : très faible teneur en acides aminés soufrés et teneur élevée en acide glutamique. D'ailleurs les protéines de A*a* migrent également en électrophorèse dans la zone des ω gliadines, mais le nombre très faible de résidus proline présents dans ces sous-unités du pic A*a* et leur teneur importante en glycine excluent l'assimilation de l'ensemble des protéines de cette fraction aux ω gliadines. Il s'agit plutôt de la fraction δ mise en évidence par AURIAU *et al.* (1976). Quant aux sous-unités $A_\alpha$ retenues sur l'échangeur de cations, bien qu'elles migrent en électrophorèse dans une zone voisine de

TABLEAU 3

*Composition en acides aminés* (1) *des sous-unités des gluténines solubles* (A) *réduites et alkylées obtenues par chromatographie sur Sephadex SPC50. Comparaison avec les sous-unités des protéines alcoolosolubles* (*P.A.S.*) *regroupées par tamisage moléculaire dans le pic exclu sur Sephadex G 100* (CHARBONNIER 1973).

| | | Sous-unités des gluténines (A) solubles réduites | | | | | | | Sous-unités des P.A.S. (CHARBONNIER) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | $A_a$ | $A_b$ | $A_c$ | $A_d$ | Aα | Aβ | Aγ | ω | γ′ | β′ | $a_2$ | $a_3$ |
| P. 100 de A (2) | 100 | 8,1 | 14,1 | 8,6 | 6,9 | 27,4 | 23,2 | 11,4 | | | | | |
| Asp. | 31 | 14 | 18 | 18 | 25 | 49 | 74 | 61 | 6 | 22 | 29 | 69 | 61 |
| Thr. | 31 | 26 | 23 | 20 | 26 | 42 | 42 | 40 | 13 | 21 | 21 | 39 | 46 |
| Ser. | 63 | 67 | 57 | 62 | 78 | 66 | 63 | 91 | 39 | 51 | 54 | 67 | 69 |
| Glu. | 325 | 493 | 385 | 372 | 432 | 274 | 181 | 154 | 515 | 396 | 382 | 146 | 176 |
| Prol | 132 | 21 | 175 | 197 | 18 | 119 | 64 | 71 | 212 | 163 | 162 | 104 | 111 |
| Gly. | 66 | 112 | 36 | 30 | 38 | 55 | 91 | 130 | 18 | 31 | 30 | 91 | 79 |
| Ala. | 37 | 27 | 25 | 25 | 31 | 51 | 58 | 52 | 9 | 34 | 33 | 81 | 59 |
| Val. | 47 | 34 | 41 | 48 | 58 | 65 | 69 | 62 | 6 | 44 | 49 | 71 | 61 |
| Cys. | 21 | 2 | 21 | 12 | 24 | 21 | 19 | 39 | 1 | 41 | 29 | 66 | 47 |
| Met. | 12 | 2 | 12 | 8 | 20 | 10 | 13 | 11 | 1 | 12 | 8 | 10 | 16 |
| Ile | 36 | 29 | 38 | 39 | 47 | 45 | 41 | 32 | 30 | 42 | 44 | 40 | 30 |
| Leu. | 72 | 59 | 70 | 74 | 86 | 72 | 82 | 61 | 32 | 67 | 72 | 79 | 90 |
| Tyr. | 24 | 29 | 16 | 13 | 15 | 19 | 22 | 13 | 11 | 16 | 14 | 26 | 36 |
| Phe. | 35 | 50 | 46 | 43 | 48 | 25 | 39 | 34 | 82 | 46 | 43 | 21 | 27 |
| Lys. | 17 | 9 | 5 | 5 | 9 | 23 | 53 | 51 | 5 | 5 | 4 | 31 | 25 |
| His. | 18 | 11 | 13 | 16 | 21 | 30 | 18 | 9 | 8 | 14 | 10 | 16 | 16 |
| Arg. | 32 | 13 | 19 | 18 | 24 | 34 | 73 | 85 | 12 | 15 | 15 | 44 | 51 |

(1) Résultats exprimés en mole de chaque résidu pour 1 000 moles de résidus totaux dosés.
(2) Importance relative des fractions A, dosées par la méthode de LOWRY.

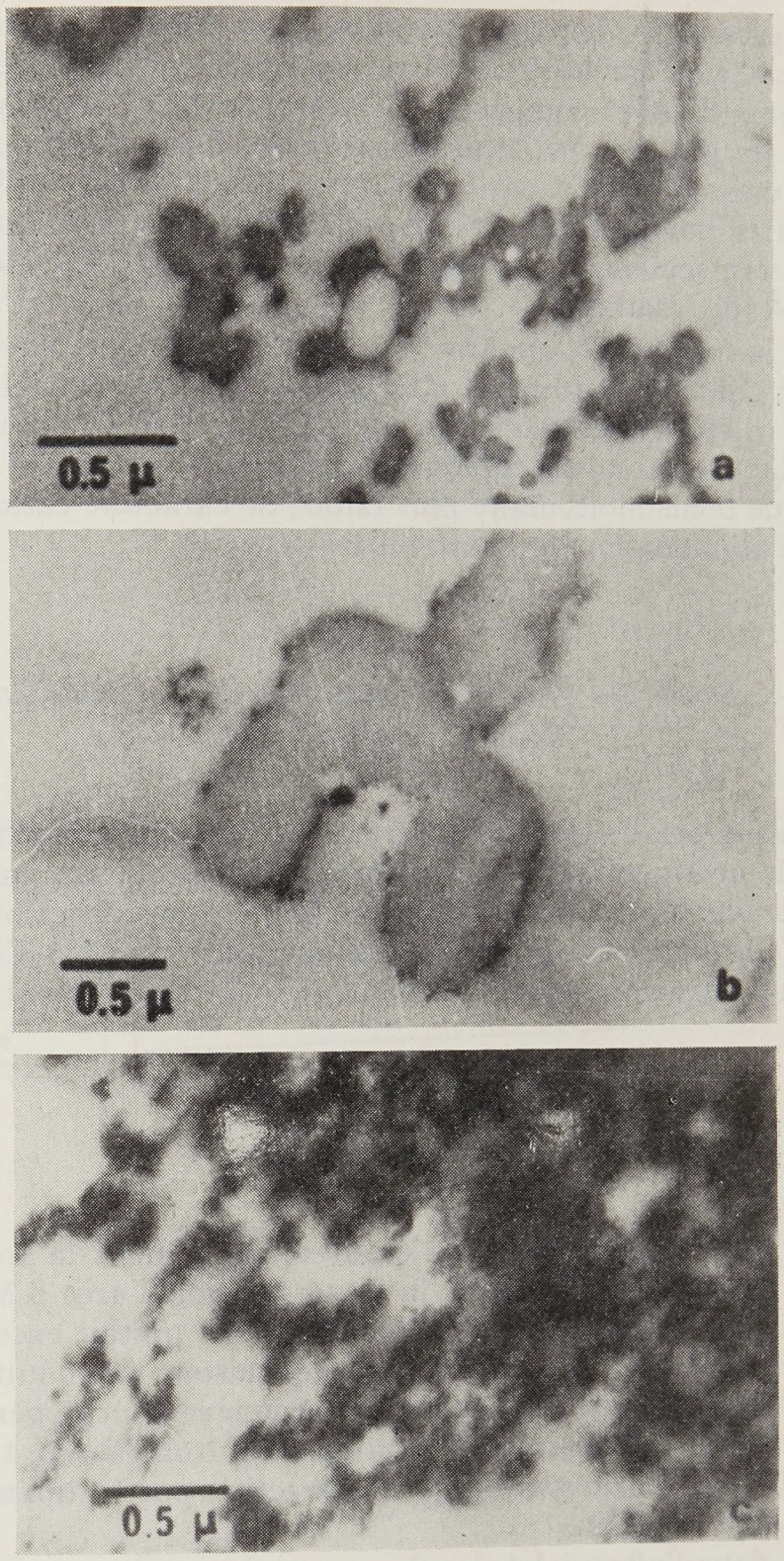



FIG. 7. — *Structure submicroscopique des fractions des gluténines solubles, réduites et alkylées (A) obtenues par tamisage moléculaire sur Sephadex G 100. Fixation par l'acide osmique ($OsO_4$).*

*7a* : $A_1$ *7b* : $A_2$ *7c* : $A_3$

celle des gliadines réduites et alkylées, elles se différencient de ces protéines par leur teneur très supérieure en acides aminés basiques. Ces protéines ont une composition en acides aminés intermédiaire entre celle des α-gliadines et celle des albumines séparées en $a_2$ et $a_3$ par CHARBONNIER (1973). La singularité, par rapport aux autres composants de A d'une part et aux gliadines d'autre part, des protéines isolées dans le pic $A_3$ et dans les fractions $A_\alpha$ et dans une certaine mesure $A_\beta$ est confirmée par les examens au microscope électronique.

$A_n$ (fig. 2*a*) est en grande partie constituée de fragments lisses et compacts (P) comme la gliadine, avec quelques zones réticulaires. $A_1$ (fig. 7*a*) semble être formé de petits fragments lisses et compacts, du type « gliadine ». $A_2$ (fig. 7*b*), plus hétérogène, contient en plus des petits granules et des filaments fins; son aspect rappelle celui du pic exclu obtenu par tamisage moléculaire sur Sephadex G 100 des protéines du gluten solubles dans le dioxanne à 40 p. 100 (Crozet 1976). Dans $A_3$ (fig. 7*c*), on observe seulement des aggrégats formés par des réseaux de fibrilles d'environ 100 Å de diamètre.

En résumé, la fraction A, apparaît constituée d'une part de sous-unités similaires à celles des gliadines réduites et alkylées, par leur mobilité électrophorétique, leur diagramme d'élution en tamisage moléculaire, leur composition en acides aminés, leur structure submicroscopique, d'autre part de chaînes polypeptidiques plus spécifiques de poids moléculaire plus faible, de caractère cationique plus marqué et d'aspect submicroscopique particulier.

## III. — *Étude des gluténines insolubles dans l'acide acétique réduites et alkylées (B)*

On connaît encore peu de choses concernant la partie résiduelle du gluten insoluble dans l'acide acétique dilué. Les auteurs, peu nombreux, qui en ont étudié les protéines ne travaillent en général que sur la fraction extractible par des agents très dispersants (Cluskey et Dimler, 1967) Inamine *et al.*, 1967, Cole *et al.*, 1973). Or cette fraction peut varier qualitativement et quantitativement selon le solvant utilisé.

### A. — *Délipidation*

Nous avons essayé tout d'abord d'étudier directement la fraction $B_n$. Mais il est apparu qu'il était très difficile de la disperser dans l'urée 8 M pour la réduction et l'alkylation, et qu'après ces traitements, elle se prêtait encore très mal aux différents fractionnements. Nous avons, pour ces raisons, introduit une étape préliminaire de double délipidation, en utilisant successivement le pentane et le chloroforme. Par cette double extraction on solubilise environ 8 à 9 p. 100 de la matière sèche du résidu $B_n$ (résidu du gluten après extraction par le dioxanne à 40 p. 100 puis l'acide acétique 0,01 N).

Les spectres dans l'ultraviolet des deux extraits montrent qu'ils contiennent des protéines. Afin de séparer ces dernières des lipides libres, nous avons soumis les extraits à un tamisage moléculaire sur verre poreux Corning (diamètre des pores : 80 Å) en utilisant comme solvant le pentane et le chloroforme respectivement. Les diagrammes d'élution obtenus dans les deux cas se ressemblent et présentent deux pics protéiques principaux (fig. 8). La caractéristique des protéines du pic 2 est qu'elles restent adsorbées sur la colonne. Pour leur désorption, il est nécessaire d'utiliser les mélanges pentane-éthanol et chloroforme-éthanol (V/V) respectivement. Nous n'avons pas caractérisé davantage ces protéines. Cependant nous pouvons noter que leur comportement en tamisage moléculaire sur verre poreux ressemble beaucoup à celui des purothionines soumises à une filtration sur gel sur Sephadex LH 20 (Redman et Fischer, 1968).

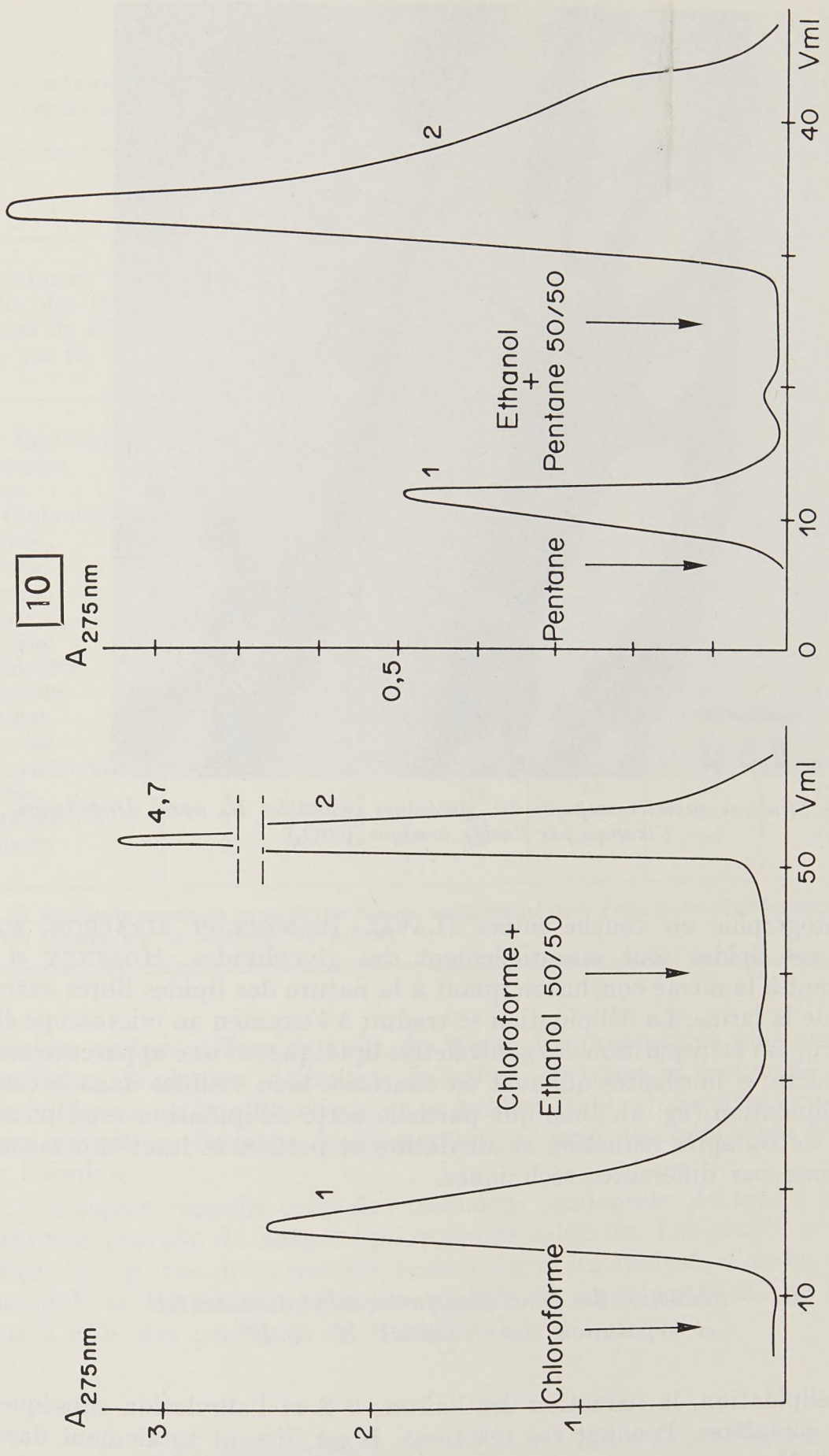



FIG. 8a.




FIG. 8b.

FIG. 8. — *Chromatographie sur billes de verre poreux* (CORNING CPG 10-80 Å) *des extraits par le pentane* (fig. 8*a*) *puis par le chloroforme* (fig. 8*b*) *des gluténines insolubles dans l'acide acétique* ($B_n$).

Dans le but de définir la nature des lipides libres contenus dans ces extraits, nous les avons séparés des protéines qui les accompagnent par la technique de HOSENEY *et al.* (1970*a*).

La double révélation par l'acide sulfurique et le réactif à l'α-naphtol après

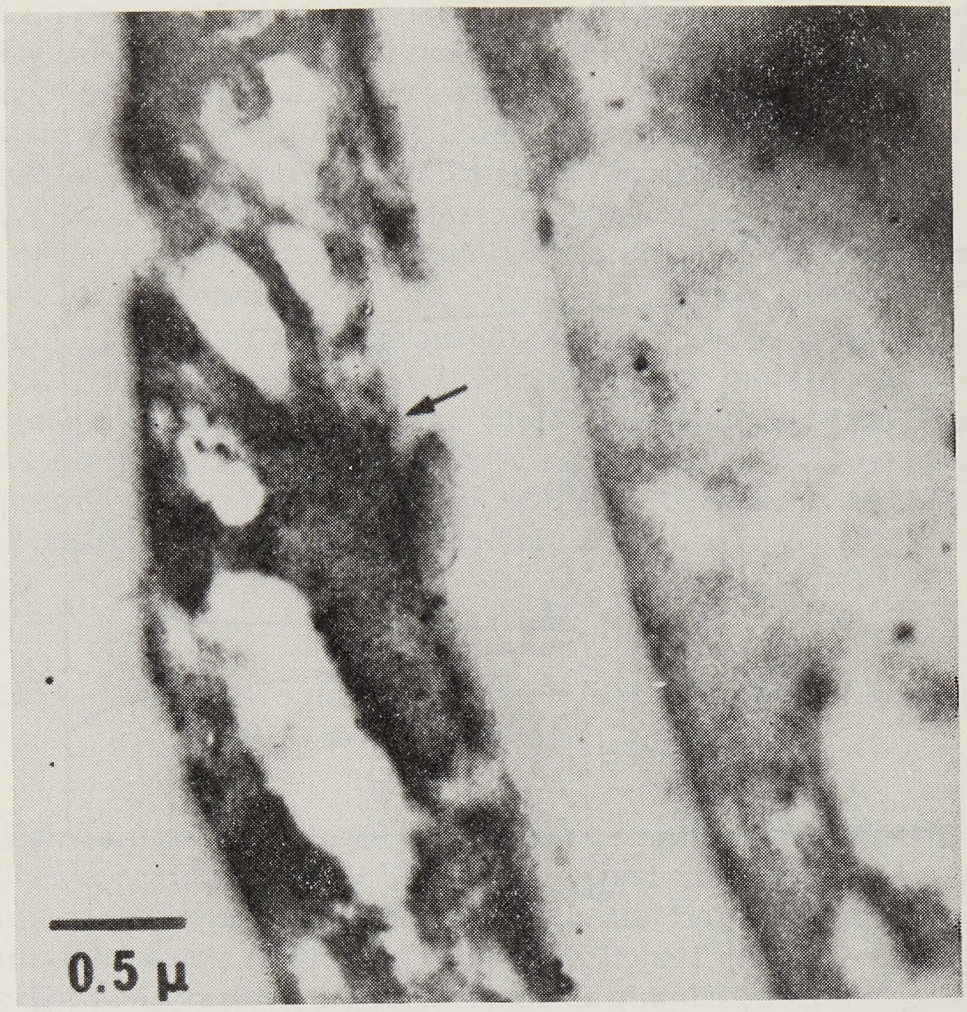



FIG. 9. — *Structure submicroscopique des gluténines insolubles $B_n$ après délipidation. Fixation par l'acide osmique ($OsO_4$).*

leur chromatographie en couche mince (LAVAL-JEANTET et DRAPRON, 1971) montre que ces lipides sont essentiellement des glycolipides. HOSENEY *et al.* (1970*b*) arrivent à la même conclusion quant à la nature des lipides libres extraits directement de la farine. La délipidation se traduit à l'examen au microscope électronique (fig. 9) par la disparition des gouttelettes lipidiques et une apparence moins claire des structures fibrillaires qui sont au contraire bien visibles dans le cas de $B_n$ avant délipidation (fig. 2). Bien que partielle cette délipidation rend possible la dispersion de $B_n$ après réduction et alkylation et permet le fractionnement de ses constituants par différentes techniques.

### B. — *Réduction des ponts disulfures, alkylation des SH et séparation des fractions B′ et B″*

Après délipidation, la réduction des liaisons S-S et l'alkylation subséquente des SH sont complètes. Pendant ces réactions, B est dissout totalement dans le milieu urée 8 M.

Après dialyse du milieu de réaction contre de l'acide acétique 0,01 N il apparaît un précipité très gonflé. Ce précipité, que nous appellerons B′, peut être séparé de la partie soluble B″ par centrifugation. B′ représente environ 10 p. 100 de la matière sèche de B et contient à peu près 20 p. 100 de N × 5,7; sa composition

TABLEAU 4

*Composition en acides aminés* (1) *des fractions B′ et B″ des gluténines (B) insolubles dans l'acide acétique et des sous-unités de B″ obtenues par chromatographie d'échange d'anions*

| | $B_n$ | B′ | B″ | $B_1''$ | $B_2''$ | $B_3''$ | $B_4''$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Importance relative des fractions de B″ en p. 100 (2) . . . | | | 100 | 60 | 9 | 26 | 5 |
| Ac. Aspartique . | 43 | 67 | 43 | 18 | 49 | 84 | Traces |
| Thréonine. . . . | 39 | 44 | 39 | 29 | 45 | 44 | |
| Sérine . . . . . | 61 | 65 | 63 | 65 | 68 | 67 | |
| Ac. Glutamique . | 261 | 151 | 258 | 351 | 239 | 167 | |
| Proline . . . . . | 109 | 83 | 107 | 162 | 109 | 76 | |
| Glycine. . . . . | 71 | 105 | 70 | 65 | 96 | 87 | |
| Alanine. . . . . | 59 | 73 | 56 | 33 | 67 | 77 | |
| Valine . . . . . | 53 | 68 | 52 | 39 | 58 | 64 | |
| Cystéine . . . . | 17 | 8 | 21 | 18 | traces | 7 | |
| Méthionine . . . | 17 | 16 | 18 | 12 | traces | 13 | |
| Isoleucine. . . . | 41 | 44 | 41 | 36 | 43 | 44 | |
| Leucine. . . . . | 71 | 82 | 71 | 61 | 77 | 82 | |
| Tyrosine . . . . | 26 | 27 | 26 | 24 | 25 | 29 | |
| Phénylalanine . . | 40 | 38 | 40 | 38 | 36 | 41 | |
| Lysine . . . . . | 33 | 52 | 33 | 11 | 28 | 49 | |
| Histidine . . . . | 21 | 23 | 25 | 16 | 21 | 23 | |
| Arginine . . . . | 37 | 53 | 38 | 23 | 40 | 46 | |

(1) Résultats exprimés en moles de chaque acide aminé pour 1 000 moles d'acides aminés totaux dosés.
(2) Dosage par la méthode de LOWRY.

en acides aminés diffère de celle de B par des proportions plus grandes d'acide aspartique, de glycine, d'alanine, de valine, de lysine et d'arginine et de teneurs plus faibles en acide glutamique et en proline (tabl. 4). Sa structure submicroscopique montre un feutrage de filaments fins, avec quelques amas très contrastés par l'osmium.

Cet aspect rappelle celui des inclusions osmiophiles de type I observées par SIMMONDS (1972*b*), de nature lipoprotéique selon lui. Les protéines de B″ représentent 63,3 p. 100 de sa matière sèche d'après les analyses d'acides aminés. Dans l'ensemble la composition en acides aminés des protéines de B″ est presque identique à celle des protéines de B (tabl. 4).

### C. — *Fractionnement de B″ et caractérisation de ses constituants*

Le tamisage moléculaire de B″ n'a pas donné des résultats intéressant notre propos. Les séparations les plus satisfaisantes ont été obtenues sur verre poreux Corning CPG 240 Å dans le solvant dioxanne à 40 p. 100 + KCl 0,25 M. Le dia-

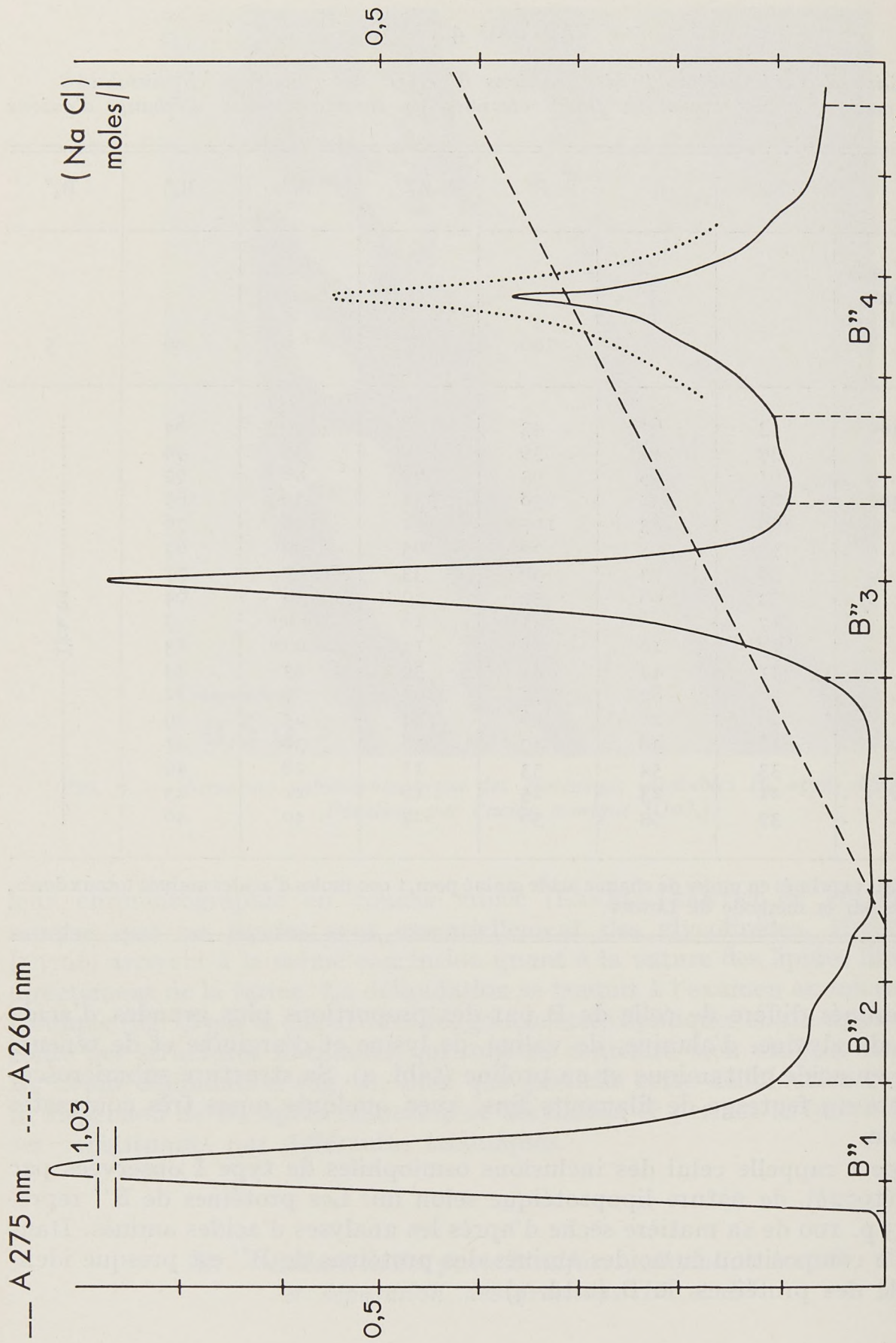



FIG. 10. — *Chromatographie d'échange d'anions sur DEAE Sephadex $A_{50}$ de la Fraction B" des gluténines insolubles réduites et alkylées (B).*
— Tampon : tris-HCl 0,1 M Urée 6 M pH 7,6).

gramme d'élution permet de distinguer 4 pics principaux, mais mal résolus. Chacun d'eux est très hétérogène en électrophorèse sur gel d'amidon; ils présentent tous trois des structures submicroscopiques lisses très semblables. Le refractionnement de ces pics dans les mêmes conditions n'améliore pas de manière appréciable la séparation; chaque pic donne à nouveau des fractions mal résolues qui couvrent pratiquement l'ensemble du domaine de fractionnement.

La chromatographie d'échange d'anions sur DEAE Sephadex A 50 permet de distinguer 2 fractions éluées avant l'établissement du gradient ionique, et 2 pics désorbés par lui, appelés respectivement $B_1''$, $B_2''$, $B_3''$, $B_4''$ (fig. 10).

Le dosage des protéines par la méthode de LOWRY montre que la récupération est totale. La distribution des protéines entre les 4 fractions est donnée dans le tableau 4. $B_4''$ a un spectre d'absorption qui ressemble à celui d'acides nucléiques, avec un maximum à 260 nm; elle contient 5 p. 100 des protéines initiales selon le dosage de LOWRY et seulement des traces selon les analyses d'acides aminés (tabl. 4).

Aussi, il est probable que $B_4''$ est essentiellement constitué d'acides nucléiques. Cette hypothèse permettrait d'expliquer que les sous-unités protéiques de cette fraction aient tendance à migrer vers l'anode même à pH 3,2 (fig. 11). En effet même à ce pH des complexes protéines-acides nucléiques sont susceptibles de présenter encore des groupements carboxyliques dissociés.

L'analyse des compositions en acides aminés de $B_1''$, $B_2''$ et $B_3''$ révèle des différences intéressantes (tabl. 4). La composition en acides aminés de $B_1''$ et son diagramme électrophorétique ressemblent à ceux des gliadines réduites et alkylées. Les taux d'acide glutamique (probablement sous forme de glutamine, puisque $B_1''$ à pH 7,4 a un caractère cationique) et de proline sont particulièrement élevés, et la teneur en lysine faible. $B_2''$ et spécialement $B_3''$ se caractérisent par des quantités remarquablement importantes de résidus basiques et d'acide aspartique; la proportion des résidus glutamyl et prolyl est relativement basse dans le cas de $B_3''$. Une autre particularité de ces deux fractions est le petit nombre de résidus

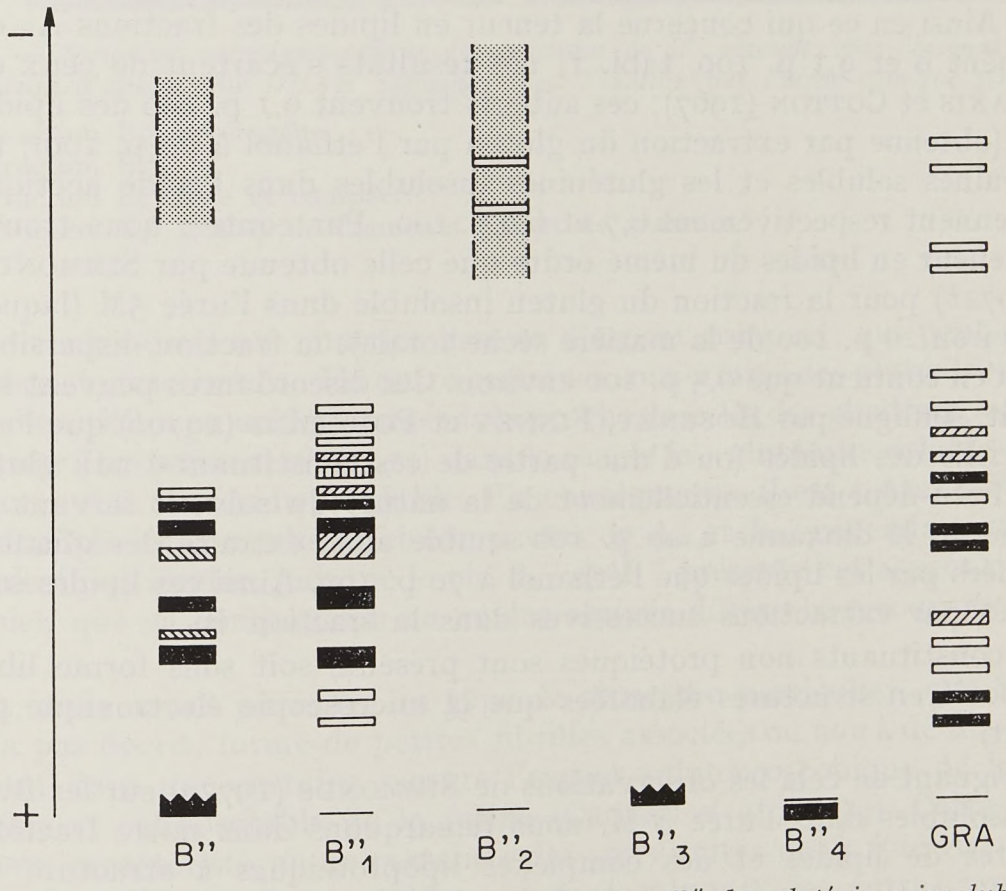



FIG. 11. — *Électrophorèse sur gel d'amidon de la fraction B'' des gluténines insolubles réduites et alkylées (B) et de leurs fractions obtenues par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE Sephadex A*$_{50}$.

GRA : gliadines réduites et alkylées.

cystéinyls qu'elles contiennent. $B_2''$ et $B_3''$ par leur composition en acides aminés semblent donc être des protéines d'un type très différent des gliadines. Cette hypothèse paraît confirmée par l'allure de leur diagramme électrophorétique; en effet $B_2''$ présente seulement quelques bandes et des traînées dans la zone des albumines et $B_3''$ ne migre quasiment pas. Ces quatre fractions diffèrent également par leur aspect submicroscopique : $B_1''$ (fig. 12*a*) a une structure hétérogène avec des fragments lisses peu contrastés et des zones fibrillaires parsemées d'amas ponctuels très contrastés; $B_2''$ (fig. 12*b*) est comparable à $B_1''$ mais les zones contrastées sont ici plus compactes et dépourvues des amas précédents; $B_3''$ (fig. 12*c*) est au contraire parfaitement lisse, compacte et peu contrastée, rappelant l'aspect des gliadines. Quant à $B_4''$ (fig. 12*d*), dont nous avons noté la nature essentiellement non protéique, elle présente une structure particulière qui ressemble à celle de B' : elle est formée de filaments fins auxquels sont associés de petites granules osmiophiles.

## Discussion

Les résultats obtenus par analyse biochimique et microscopie électronique par transmission mettent en évidence la complexité et la double hétérogénéité, physicochimique et structurale, de cette fraction du gluten insoluble dans le dioxanne à 40 p. 100. En effet cette fraction contient outre les gluténines, qui comprennent elles-mêmes différents types de protéines, des lipides, des acides nucléiques ainsi que des polyosides (Massicot, 1975), en proportion d'ailleurs variables suivant les auteurs. Ainsi en ce qui concerne la teneur en lipides des fractions $A_n$ et $B_n$ (respectivement 0 et 9,1 p. 100, tabl. 1) nos résultats s'écartent de ceux de Ponte, de Stefanis et Cotton (1967); ces auteurs trouvent 9,1 p. 100 des lipides dans la gliadine (obtenue par extraction du gluten par l'éthanol à 70 p. 100), tandis que les gluténines solubles et les gluténines insolubles dans l'acide acétique 0,01 N en contiennent respectivement 6,7 et 6,9 p. 100. Par contre, nous trouvons pour $B_n$ une teneur en lipides du même ordre que celle obtenue par Simmonds et Wrigley (1972*b*) pour la fraction du gluten insoluble dans l'urée 5M (laquelle représente environ 20 p. 100 de la matière sèche totale); la fraction dispersible dans ce solvant n'en contient que 0,5 p. 100 environ. Ces discordances peuvent s'expliquer par le fait, souligné par Hoseney, Finney et Pomeranz (1970*b*) que l'association préférentielle des lipides (ou d'une partie de ces constituants) aux gluténines ou aux gliadines dépend essentiellement de la nature du solvant servant à extraire ces dernières; le dioxanne à 40 p. 100 semble ainsi extraire des gliadines moins contaminées par les lipides que l'éthanol à 70 p. 100. Ainsi ces lipides se trouvent concentrés par extractions successives dans la fraction $B_n$.

Ces constituants non protéiques sont présents soit sous forme libre, soit à l'état associé en structures élaborées que la microscopie électronique permet de distinguer.

Rejoignant en cela les observations de Simmonds (1972*a*) sur les fractions du gluten insolubles dans l'urée 4 M, nous remarquons dans notre fraction $B_n$ des gouttelettes de lipides et des complexes lipoprotéiques à structure fibrillaire, certains d'entre eux correspondant à des fragments plus ou moins dégradés de membranes et de réticulum endoplasmique, et d'autres étant probablement formés au cours des différents traitements, dont la préparation des échantillons pour la microscopie électronique (Simmonds, 1972*a*). Ces deux types d'inclusions osmio-

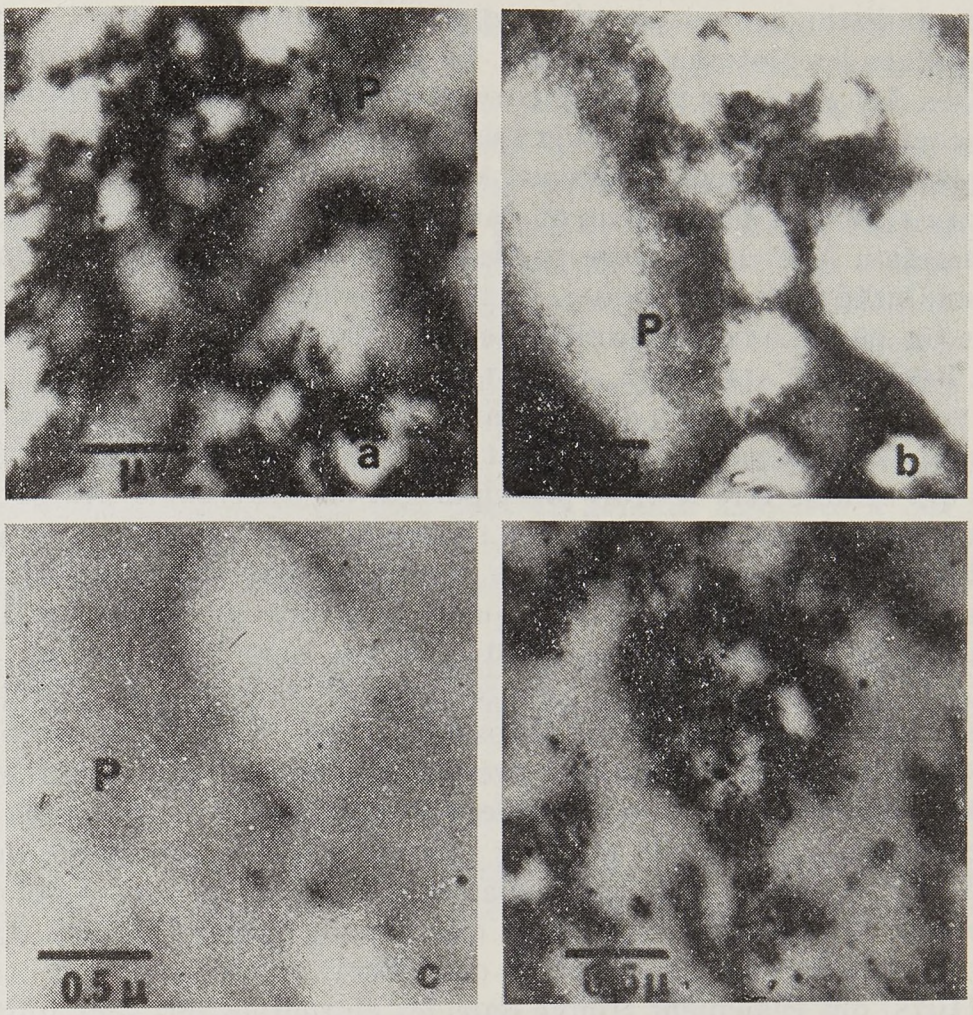



FIG. 12. — *Structure submicroscopique des fractions de B″ obtenues par chromatographie d'échange d'anions sur DEAE Sephadex $A_{50}$. Fixation par l'acide osmique ($OsO_4$).*

*a*) Fraction $B_1''$ hétérogène.
*b*) Fraction $B_2''$.
*c*) Fraction $B_3''$ lisse et compacte.
*d*) Fraction $B_4''$ formée de filaments fins et de granules.

philes sont inclus dans une matrice lisse et d'aspect compact, qui peut être aussi observée dans la fraction $A_n$. En outre certaines sous-unités des gluténines réduites ont une composition en acides aminés très proche de celle des gliadines, comme ont pu le montrer HUEBNER *et al.* (1974) dans le cas de la « gluténine soluble » et nous-mêmes dans celui du résidu insoluble. En conséquence, il est tentant d'attribuer à ces sous-unités les zones lisses et compactes de $A_n$ et $B_n$; cependant, cette assimilation n'est pas fondée, puisque le pic $B_3''$ de B″ présente cet aspect submicroscopique bien que sa composition en acides aminés diffère beaucoup de celle des gliadines.

Enfin, nous avons pu noter un type de structure particulier, que SIMMONDS (1972), n'a pas décrit, formé de petites fibrilles associées ou non à de fins granules, et rappelant dans une certaine mesure l'aspect submicroscopique de la fraction hydrosoluble et salinosoluble de la farine (CROZET *et al.*, 1974). Cette structure semble assez caractéristique de certaines des sous-unités de A (pic $A_3$, $A_\alpha$) et de B ($B_2''$), qui se différencient notablement de la plupart des autres protéines du gluten par leur poids moléculaire (pic $A_3$) ou leur composition en acides aminés. Ces protéines de structure hétérogène, sont probablement associées à des substances non protéiques.

On peut distinguer en première approximation deux types principaux des sous-unités dans les gluténines réduites. Le premier inclut les sous-unités qui sont très proches des gliadines par leur composition en acides aminés et leur aspect submicroscopique. On les trouve à la fois dans des gluténines solubles et les gluténines insolubles dans l'acide acétique; elles forment la fraction C de HUEBNER *et al.* (1974*a*-1974*b*) et probablement dans une certaine mesure les pics A*b* et A*c* de notre fraction A, et la majeure partie du pic $B_1''$ de notre fraction B; la différence de solubilité reste à expliquer. Ce type de constituants correspond probablement plus ou moins aux sous-unités de type gliadine reconnues dans les gluténines par BIETZ et WALL (1972, 1973, 1975), et par CHARBONNIER (1973) dans le pic exclu sur Sephadex G 100 des protéines alcoolosolubles. Les chaînes polypeptidiques sont probablement liées à l'état natif par des ponts dissulfurés intercaténaires, ce qui semble être le trait principal qui les différencie des gliadines.

Dans le second type de sous-unités, sûrement plus hétérogène, on peut regrouper les chaînes polypeptidiques qui ne partagent pas la composition en acides aminés particulières du premier, mais qui se rapprochent plutôt des albumines et des globulines de ce point de vue. C'est le cas de nos pics $B_2''$ et $B_3''$ et des fractions A et (dans une moindre mesure) B de HUEBNER *et al.* (1974 *a* et *b*), de $a_2$ et $a_3$ de CHARBONNIER (1973). La plupart de leurs constituants semblent différer aussi des chaînes polypeptidiques du premier type en ce qui concerne leurs poids moléculaires. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodecyl sulfate de sodium a permis de montrer que les principaux composants de notre sous-unité $B_3''$ ont des poids moléculaires d'environ 63 000, 57 000 et 50 000 respectivement (MASSICOT, 1975) alors que les sous-unités de type gliadine ont des poids moléculaires de 44 000 et 36 000 (BIETZ et WALL, 1972, 1975); BIETZ et WALL (1975) ont également trouvé dans les gluténines des sous-unités de poids moléculaires (64 000 et 71 000) intermédiaires entre ceux des sous-unités à haut poids moléculaire d'une part et ceux des sous-unités de types gliadine d'autre part, présentes aussi dans les extraits salins de la farine. Par ailleurs, $B_2''$ paraît donner une bande unique en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodecylsulfate de sodium, qui correspond à une chaîne polypeptidique de poids moléculaire voisin de 81 000 (MASSICOT, 1975). Peut-être faudrait-il inclure aussi dans le même type certains constituants dont la présence a été souvent notée et que l'on assimile à des albumines et des globulines contaminantes à cause de leur faible poids moléculaire (BIETZ et WALL, 1975). Beaucoup des protéines qui appartiennent au second type sont sans doute associées à des constituants lipidiques, glucidiques ou nucléiques, qui correspondent à des fragments de structures cellulaires; l'association pourrait être partiellement rompue par l'urée ou la réduction, d'où l'existence du pic $B_3''$, dépourvu de structure submicroscopique mais possédant une composition en acides aminés du type « albumine ».

## Conclusion

Si les gliadines représentent dans l'ensemble une classe de protéines ayant un certain nombre de caractéristiques communes, comme leurs propriétés de solubilité comparables, leurs compositions en acides aminés voisines, des ponts disulfures intercaténaires, un aspect lisse et compact en microscopie électronique à transmission, les gluténines apparaissent par contre former une classe protéique difficile à caractériser.

Nous avons mis en évidence au sein des protéines de cette classe l'existence de deux grands types de sous-unités dont les propriétés physico-chimiques et les structures submicroscopiques sont très dissemblables. Certaines ressemblent sous plusieurs aspects aux gliadines (composition en acides aminés, aspect submicroscopique lisse) d'autres se rapprochent plutôt des protéines solubles. Nous pensons que les sous-unités du premier groupe, associées par liaisons disulfures intercaténaires, forment avant réduction un réseau protéique dense, difficile à solubiliser. A titre d'hypothèse, nous suggérons que les sous-unités du deuxième groupe correspondent à des protéines différentes, qui sont libérées par la réduction, la délipidation, et l'action de l'urée, des structures cellulaires auxquelles elles participent ou dans lesquelles elles sont emprisonnées.

L'observation des fractions qui regroupent ces sous-unités au microscope électronique montre en effet qu'elles sont en général associées à des substances non protéiques provenant vraisemblablement du réticulum endoplasmique. Il est probable que ces protéines ont dans les cellules de l'endosperme un rôle fonctionnel ou structural.

A partir de cette hypothèse, il semblerait qu'il soit peut-être plus fondé de substituer à la distinction classique entre gliadines et gluténines, celle entre :

— protéines ayant un rôle de réserve dans lesquelles on regroupe les gliadines et la fraction des gluténines constituée des sous-unités du premier type;

— protéines ayant eu un rôle fonctionnel ou structural dont la composition en acides aminés est totalement différente de celle des protéines dites « de réserve ».

*Reçu pour publication en mai 1979.*

## Summary

*Biochemical and submicroscopic study of glutenins*

Extraction of gluten with a 40 p. 100 dioxane-water mixture yields an insoluble residue which groups the major part of glutenins.

This residue can be separated by 0,01N acetic acid extraction into a dispersible fraction ($A_n$) and an insoluble one ($B_n$). In order to account for their heterogeneity, both biochemical and submicroscopic, $A_n$ and $B_n$ have been submitted to molecular sieving and ion-exchange chromatography after reduction-alkylation, and the resulting fractions have been characterized by their gel electrophoresis patterns, amino acid compositions and submicroscopic aspect (transmission electron microscopy).

Attention has been devoted to lipids and nucleic acids and to their relations with proteic constituents.

The fractionation procedure on reduced-alkylated $A_n$ and $B_n$ leads to the separation of one nucleic and several proteic peaks. The protein subunits constitutive of these fractions can be grouped into two types according to their characteristics. One is very near of gliadins. The subunits of the others have an amino acid composition of the albumins-globulins type; part of them shows submicroscopic structures, which indicates probably that they are likely to be involved in the subcellular structures observed in $B_n$ in its initial state.

On the ground of their results, the authors propose the hypothesis that what is called " glutenins " groups in fact two very different classes of proteins.

The first would constitute with gliadins, from which they differ essentially by the intermolecular nature of their disulfide linkages, the storage proteins class, characteristic of cereals. The second would correspond to proteins with a functional role in the cell.

## Références bibliographiques


AURIAU P., AUTRAN J. C., CHARBONNIER L., DOUSSINAULT G., FEILLET P., GODON B., GRIGNAC P., JOUDRIER P., KOBREHEL K., KOLLER J., ROUSSET H., RIVALLANT S., 1976. Variabilité génétique de la composition des gliadines, gluténines, β-amylases, α-esterases, peroxydases et phosphatases acide du blé (T. *Aestivum*), *Ann. Amélior. Plantes*, **26**, 51.

BIETZ J. A. and WALL J. S., 1972. Wheat gluten subunits. Molecular weights determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.*, **49**, 416.

BIETZ J. A. and WALL J. S., 1973. Isolation and characterization of gliadin-like subunits from glutenin. *Cereal Chem.*, **50**, 537.

BIETZ J. A. and WALL J. S., 1975. The effect of various extractants on the subunit composition and association of wheat glutenin. *Cereal Chem.*, **52**, 145.

CHARBONNIER L., 1973. Étude des protéines alcoolosolubles de la farine de blé. *Bioch.*, **55**, 1217.

CLELAND W. W., 1964. Dithioerythritol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, **3**, 480.

CLUSKEY J. E. and DIMLER R. J., 1967. Characterization of the acetic acid insoluble fraction of wheat gluten protein. *Cereal Chem.*, **44**, 611.

COLE E. W., N. G., H. and MECHAM D. K., 1973. Further studies on the fractionation and characterization of the gel proteins of wheat flour by column chromatography. *Cereal Chem.*, **50**, 336.

CRESTFIELD A. M., MOORE S. et STEIN W. H., 1963. The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.*, **238**, 622.

CROW M J. A. and ROTHFUS J. A., 1968. Chromatography of proteins from gluten. *Cereal Chem.*, **45**, 413.

CROZET N., GODON B., and GUILBOT A., 1974. Submicroscopic structure of wheat flour and gluten lipoprotein components. *Cereal Chem.*, **51**, 288.

CROZET N., 1976. Thèse A.O. 12538. Contribution à l'étude de la structure fine des constituants lipidiques protéiques et lipoprotéiques de l'albumen du grain de blé par différentes techniques de microscopie électronique.

DRAPRON R., 1975. Méthode rapide de détermination quantitative des lipides totaux dans les produits céréaliers. *Ann. Techn. Agric. I.N.R.A.*, **2**, 117.

EWART J. A. D., 1968. Fractionnal extraction of cereal proteins. *J. Sci. Fd. Agric.*, **19**, 241.

GODON B., 1969. Thèse de Doctorat d'État es-Sciences Physiques : Étude physico-chimique des associations protéiques du gluten de blé. N° d'enregistrement au C.N.R.S. : A.O. 3274.

HOSENEY R. C., POMERANZ Y. and FINNEY K. F., 1970*a*. Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour compenents. Petroleum ether soluble lipoproteins of wheat flour. *Cereal Chem.*, **47**, 153.

HOSENEY R. C., FINNEY K. F. and POMERANZ Y., 1970*b*. Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. Gliadin-lipid-glutenin interaction of wheat flour. *Cereal Chem.*, **47**, 135.

HUEBNER F. R. DONALSON G. L. and WALL J. S., 1974. Wheat glutenin subunits. II Compositional differences. *Cereal Chem.*, **51**, 240.

HUEBNER F. R. and WALL J. S., 1974. Wheat glutenin subunits. I Preparative separation by gel filtration and ion-exchange chromatography. *Cereal Chem.*, **51**, 228.

INAMINE E. S., NOBLE E. G. and MECHAM D. K., 1967. Solubilization and fractionation of wheat flour proteins insoluble in dilute acetic acid. *Cereal Chem.*, **44**, 143.

LAVAL-JEANTET A. M., DRAPRON R., 1971. Microtechnique d'analyse chromatographique des lipides. *Ann. Biol. Chim.*, **29**, 101.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. et RANDAL R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.

MASSICOT M. C., 1975. Étude comparative des gluténines insolubles dans l'acide acétique 0,01 N de deux variétés de blé : Magdalena et Maris Huntsman. Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Études Approfondies de Biochimie Industrielle et Alimentaire (Université de Paris VII).

MOORE S., 1963. On the determination of cystine as cysteic Acid. *J. Biol. Chem.*, **238**, 235.

ORTH R. A., DRONZEK B. L., BUSHUK W., 1973. Studies of glutenin IV. Microscopic structure and its relations to breadmaking quality. *Cereal Chem.*, **50**, 688-696.

PONTE J. G. Jr., DE STEFANIS V. A. and COTTON R. H., 1967. Studies of gluten lipids. Distribution of lipids in gluten fractions separated by solubility in 70 p. 100 ethanol. *Cereal Chem.*, **44**, 427.

REDMAN D. G. and FISCHER N., 1968. Fractionation and comparison of purothionin and globulin components of wheat. *J. Sci. Fd. Agric.*, **19**, 651.

SIMMONDS D. H., 1972*a*. Wheat grain morphology and its relationship to dough structure. *Cereal Chem.*, **49**, 324.

SIMMONDS D. H. and WRIGLEY C. W., 1972*b*. The effect of lipids on the solubility and molecular weight range of wheat gluten and storage proteins. *Cereal Chem.*, **49**, 317.

WOYCHIK J. H., BOUNDY J. A. et DIMLER R. J., 1961. Starch-gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 151.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (2), 181-190.

# Étude comparée de la microhétérogénéité des myoglobines de porcs normaux et exsudatifs de la race Pietrain

M. RENERRE

avec la Collaboration Technique de R. LABAS

*Station de Recherches sur la Viande, I.N.R.A., C.R.Z.V. de Theix, 63110 Beaumont*

## Résumé

Cette étude qui a porté sur dix porcs de race Piétrain pesant 90 kg (± 3 kg) a consisté à comparer la microhétérogénéité de la myoglobine de porcs normaux et de porcs exsudatifs.

On a procédé à un classement objectif des carcasses d'une part en fonction du pH relevé dans le muscle quinze minutes *post mortem* et d'autre part en fonction du test à l'halothane effectué sur l'animal vivant.

On a extrait les protéines sarcoplasmiques quinze minutes et quatre heures après l'abattage. Les protéines sarcoplasmiques ont été purifiées par passage successif sur DEAE-cellulose et sur Sephadex G 50.

La microhétérogénéité des diverses protéines sarcoplasmiques a été analysée par isoélectrofocalisation sur plaques de gel de polyacrylamide.

Il apparaît immédiatement après l'abattage une différence significative au niveau de la microhétérogénéité du pigment entre porcs normaux et exsudatifs. Cette différence ne s'observe plus lorsque la myoglobine est extraite quatre heures *post mortem*.

Mots clés : *microhétérogénéité, isoélectrofocalisation, myoglobine, porcs normaux, porcs exsudatifs.*

## Introduction

L'affection connue sous le nom de « myopathie exsudative et dépigmentaire » du porc, désigne un ensemble de perturbations biochimiques et physico-chimiques du muscle qui influence la qualité de la viande de ces animaux.

Si ce syndrome n'a pas encore été détecté *in vivo* de façon précise, on sait en revanche depuis plusieurs années, qu'il est caractérisé essentiellement par plusieurs modifications physico-chimiques dans le muscle : chute rapide de pH, faible pouvoir de rétention d'eau, couleur de la viande plus claire, mauvais rendement technologique.

Depuis les travaux de HAAN (1953), SCHAPIRA et DREYFUS (1958)..., on sait que les myopathies peuvent être caractérisées par des modifications des constituants protéiques du tissu musculaire qui sont mises en évidence par des comportements électrophorétiques différents entre les individus normaux et myopathes.

En ce qui concerne la coloration de la viande, il a été montré qu'immédiatement après l'abattage, la conjonction d'un bas pH et d'une température élevée, enregistrés quelques minutes seulement après la mort chez le porc exsudatif, avait des conséquences sur le pigment musculaire. Selon Mac LOUGHLIN (1963), il se produit une dénaturation des protéines sarcoplasmiques qui masque en quelque sorte la myoglobine « native » et réduit son pouvoir colorant. Pour CHARPENTIER (1969), il y aurait une oxydation du pigment. Plus récemment, BROWN (1972) rapporte que la myoglobine des porcs exsudatifs s'autoxyde plus rapidement que celle de porcs normaux, tandis que BEMBERS et SATTERLEE (1975) ont mis, en évidence des vitesses de migration électrophorétique différentes entre les myoglobines extraites à partir de ces deux types d'animaux.

Toutes ces observations concernant le pigment musculaire ont été réalisées après installation de la *Rigor mortis;* peu de travaux ont été conduits *in vivo.* En 1964, CHARPENTIER et GOUTEFONGEA avaient signalé des différences électrophorétiques entre les lactate déshydrogénases isolées, à partir de porcs normaux et exsudatifs, quelques minutes après la mort de l'animal. En 1971, SCHMIDT G. R. *et al.* ont montré l'existence d'une bonne corrélation entre la valeur de l'activité créatine phosphokinase et la qualité de la viande. Enfin CHEAH K. S. et CHEAH A. M. (1976) ont découvert que les mitochondries de porcs normaux et de porcs exsudatifs ont des propriétés différentes.

Disposant d'une méthode de purification du pigment musculaire, nous avons entrepris de comparer la microhétérogénéité des myoglobines de porcs normaux et de porcs exsudatifs, extraites quelques minutes seulement après la mort de l'animal. Cette étude devrait permettre de vérifier si les différences de caractéristiques des myoglobines observées par différents auteurs entre porcs normaux et porcs exsudatifs étaient dues simplement à l'effet du couple bas pH — température élevée, ou bien s'il s'agissait d'une différence fondamentale de composition de cette protéine.

## Matériel et méthodes

### *Matériel*

L'étude a porté sur 13 porcs de race Piétrain pesant 90 kg (± 3 kg).

### *Méthodes*

— L'abattage comprenait successivement : l'électrocution, la saignée et l'échaudage.

— Un échantillon de 100 g de muscle *Longissimus dorsi* était prélevé 15 minutes après la saignée. On procédait alors à un classement objectif des carcasses d'une part en fonction du pH relevé dans le muscle 15 minutes *post mortem* et d'autre part en fonction du test à l'halothane. Le test à l'halothane a été effectué sur l'animal vivant, à l'âge de 10 semaines dans les conditions décrites par EIKELENBOOM G. et MINKEMA D. (1974).

— La moitié de chaque échantillon est aussitôt broyée à l'aide d'un Polytron en présence de deux volumes de tampon Tris-HCl pH 8,6 0,01 M contenant de l'iodoacétate 5 mM. Après une heure d'extraction, on procède à une centrifugation à 5 000 G pendant 20 minutes suivie d'une filtration sur papier filtre. Une dialyse pendant une nuit contre du tampon Tris-HCl pH 8,6 0,01 M permet ensuite de précipiter une partie des protéines sarcoplasmiques contaminantes qui sont enlevées par centrifugation à 5 000 G pendant 10 minutes.

L'extrait protéique est alors partiellement purifié en présence de DEAE-cellulose dans du tampon Tris-HCl pH 8,6 0,01 M. On centrifuge à 5 000 G pendant 10 minutes et le surnageant est récupéré. Cette opération est répétée trois fois. Après concentration par membrane sous vide (Schleicher und Schüle U H 100), le surnageant est mis à dialyser pendant une nuit contre du tampon phosphate de sodium pH 7,3 0,1 M. Les protéines sarcoplasmiques sont alors fractionnées par passage sur une colonne de Sephadex G 50 (∅ 12 mm × 50 cm) (Renerre, 1977). La myoglobine ainsi purifiée est analysée par focalisation isoélectrique.

Quatre heures après l'abattage des animaux, on procédait sur les 50 grammes restants de chaque échantillon musculaire conservé à température ambiante, aux mêmes opérations d'extraction et de purification du pigment.

L'isoélectrofocalisation des différentes myoglobines est réalisée sur plaques de gel de polyacrylamide (245 mm × 110 mm × 1 mm) fabriquées par L.K.B. (Suède). Deux gammes différentes de pH sont utilisées : 3,5 — 9,5 et 5 — 8,5. Les gels sont chargés à l'aide de rectangles de papier Whatmann (3 MM) sur lesquels on dépose 15 µl de solution de protéines dont la concentration est comprise entre 1 et 2 mg/ml. Les points isoélectriques sont mesurés à l'aide d'une électrode combinée de contact à extrémité plate (Ingold n° 403-30 M 8). La myoglobine est mise en évidence par sa réaction peroxydasique avec la benzidine et les protéines sont colorées par le Bleu de Coomasie. Les bandes sont lues par densitométrie à l'aide d'un lecteur de plaques Chromoscan.

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide de la méthode du biuret et de la méthode de Folin.

L'analyse statistique des résultats repose sur l'utilisation du test « t » de comparaison des moyennes de Student.

## Résultats - discussion

### 1. — *Classement des animaux*

Sur les 13 animaux abattus, 10 ont été retenus et répartis en deux groupes de 5 sur le critère de la valeur du pH enregistré 15 minutes *post mortem*. Les animaux exsudatifs étaient ceux pour lesquels le pH était inférieur à 6,30.

On constate (tabl. 1) que ce classement correspond, à une exception près, à celui obtenu avec le test à l'halothane. Le porc n° 33 dont le pH musculaire est égal à 6,30 a été classé porc exsudatif d'après l'évolution de la valeur du pH pendant les premières heures de la *Rigor-mortis*. A contrario, le test à l'halothane le classait comme porc normal. Cette bonne correspondance entre les mesures physico-chimiques *post-mortem* et le test effectué sur l'animal vivant a été confirmé par Monin *et al.* (communication personnelle) après étude sur un plus grand nombre d'animaux.

TABLEAU 1

*Classement des animaux en porcs normaux ou en porcs exsudatifs d'après le test à l'halothane et la valeur du pH musculaire 15 minutes p.m.*

| N° Porcs | pH muscle 15′ p.m. | Test à l'halothane | Classement |
|---|---|---|---|
| 16 | 6,15 | + | Porcs exsudatifs |
| 22 | / | + | |
| 208 | 5,80 | + | |
| 280 | 5,95 | + | |
| 33 | 6,30 | — | |
| 18 | 6,40 | — | Porcs normaux |
| 24 | / | — | |
| 203 | 6,50 | — | |
| 366 | 6,40 | — | |
| 34 | 6,70 | — | |

L'analyse de l'évolution *post-mortem* du pH musculaire des différents échantillons met en évidence deux lots d'animaux assez distincts. Les valeurs moyennes des pH musculaires des animaux classés normaux et exsudatifs sont regroupés dans le tableau 2.

Si l'on compare à l'aide du test « t » les animaux normaux et les animaux exsudatifs, quel que soit le temps *post-mortem*, les valeurs de pH sont toujours significativement différentes.

TABLEAU 2

*Comparaison des pH musculaires des porcs normaux et des porcs exsudatifs à différents temps p.m.*

| | 15′ p.m. | 2 h p.m. | 4 h p.m. |
|---|---|---|---|
| Porcs normaux | 6,50 ± 0,14<br>$n = 4$ | 6,08 ± 0,04<br>$n = 3$ | 5,78 ± 0,06<br>$n = 3$ |
| Porcs exsudatifs | 6,05 ± 0,22<br>$n = 4$ | 5,61 ± 0,06<br>$n = 5$ | 5,53 ± 0,02<br>$n = 4$ |
| Test « t » : t | — 3,451 | 11,883 | 7,986 |
| Ndl | 6 | 6 | 5 |
| Δ p. 100 | 7,44 % | — 7,73 % | — 4,33 % |
| Seuil de signification | $P < 2\ \%$ | $P \ll 1\ \%$ | $P < 1\ \%$ |

## 2. — *Isoélectrofocalisation des protéines sarcoplasmiques*

### 2.1. *Analyse qualitative*

Comme l'indique la figure 1, après la première étape de purification sur DEAE-cellulose, l'isoélectrofocalisation des protéines migrant dans un gradient de pH compris entre 3,5 et 9,5, colorées au bleu de Coomasie, permet la détection d'une trentaine de bandes.

Après purification ultérieure sur tamis moléculaire de Sephadex G-50, on met en évidence trois bandes principales de focalisation dont les pI sont égaux

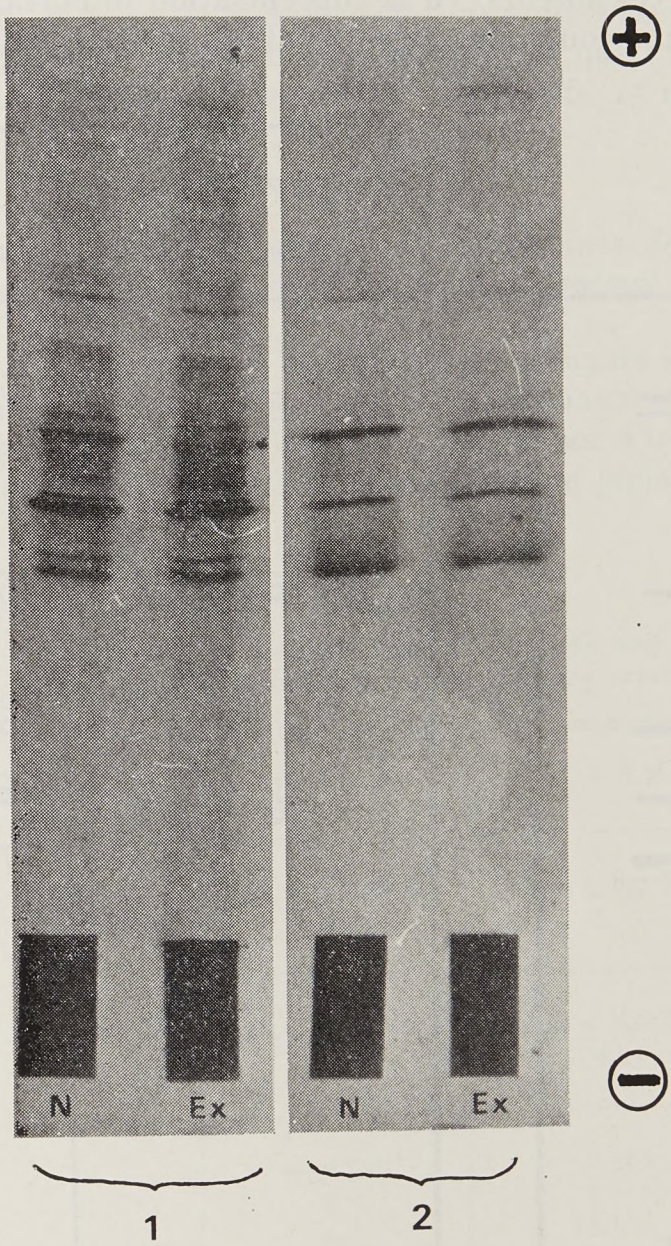



FIG. 1. — *Plaques d'isoélectrofocalisation des myoglobines de porcs normaux et de porcs exsudatifs après différents stades de purification.*

Gradient de pH : 3,5 → 9,5.
Coloration au bleu de Coomasie.
1 : Après purification sur DEAE-cellulose.
2 : Après purification sur DEAE-cellulose + Sephadex G50.
(N : porc normal; Ex : porcs exsudatifs).

à 7,0 ± 0,1; 6,7 ± 0,2 et 6,5 ± 0,1. Ces trois bandes principales sont détectées au moyen de la coloration au bleu de Coomasie et à la benzidine; ces trois bandes sont donc des hémoprotéines et correspondent à la myoglobine. Ces résultats corroborent nos observations antérieures (RENERRE, 1977). Dans ces conditions expérimentales, nous pouvons également détecter trois autres zones de focalisation qui correspondent à des protéines ayant un comportement en électrofocalisation plus anodique que la myoglobine : ces bandes ont des pI égaux à 6,2 ± 0,1; 5,5 ± 0,1 et 5,4 ± 0,1. Après coloration au bleu de Coomasie et à la benzidine, il ne nous a pas été possible de déterminer avec précision si ces trois bandes de focalisation anodique correspondaient ou non à des hémoprotéines, le nombre de bandes après coloration à la benzidine n'étant pas constant d'une préparation à l'autre. BEMBERS et SATTERLEE (1975) à partir de myoglobine extraite plusieurs heures *post-mortem*, signalent l'existence d'une zone de focalisation importante dont le pI est voisin de 5,5; pour ces auteurs, vu la concentration importante de cette zone de focalisation dans leurs conditions expérimentales, ce phénomène ne serait pas dû

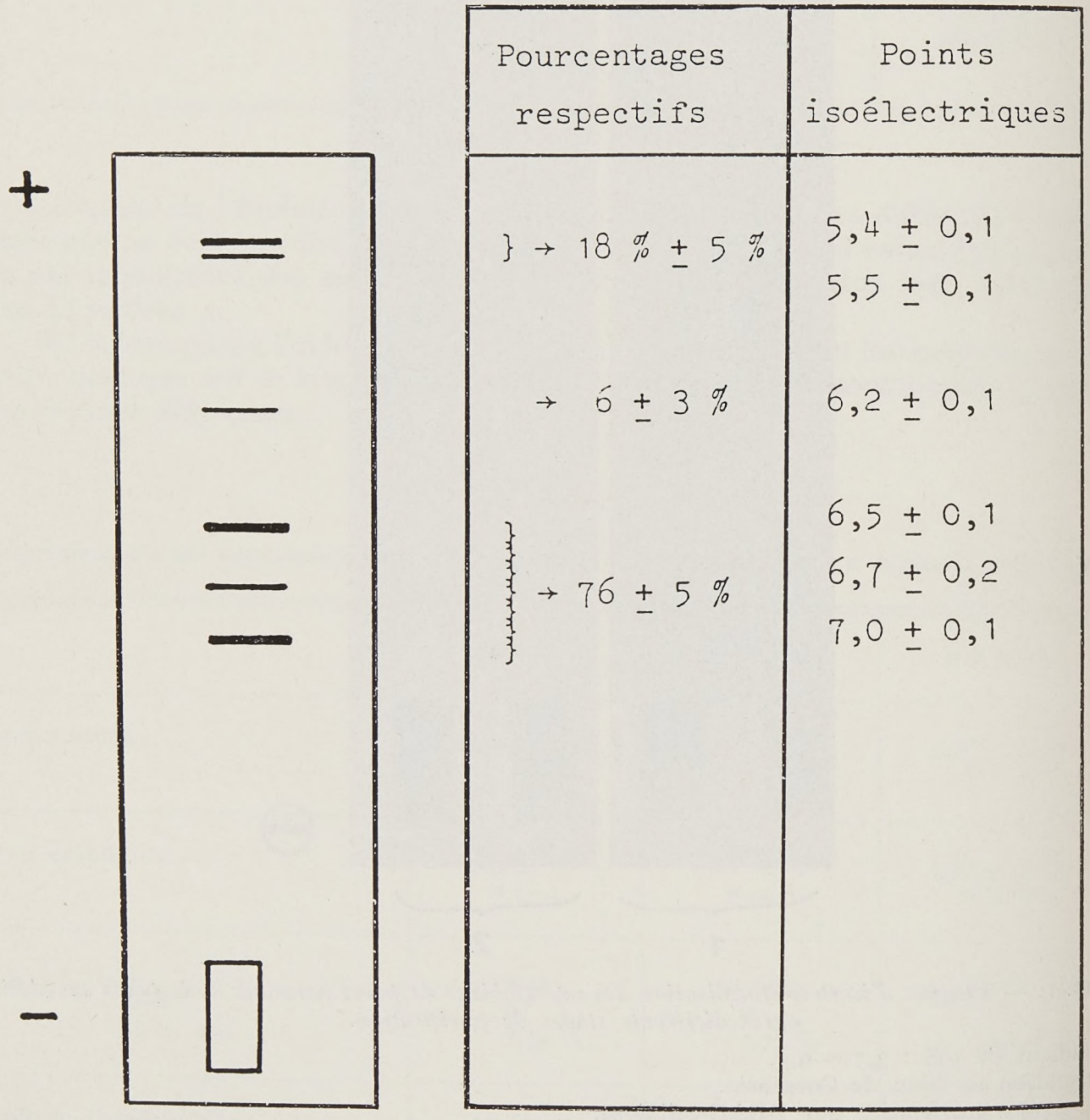



FIG. 2. — *Pourcentages respectifs des différentes zones de focalisation de la myoglobine de porcs après purification sur DEAE-cellulose + Sephadex G-50 et coloration au bleu de Coomasie.*

à la microhétérogénéité du pigment mais serait vraisemblablement un composant caractéristique de la myoglobine porcine.

D'une façon générale, quels que soient les échantillons musculaires considérés, examinés 15 minutes ou 4 heures *post-mortem*, on ne note pas de différences en ce qui concerne les positions et le nombre des zones de focalisation. Ces résultats corroborent ceux de CHARPENTIER et GOUTEFONGEA (1963) effectués sur l'espèce porcine après examen par électrophorèse de protéines sarcoplasmiques.

### 2.2. — *Analyse quantitative*

Le pourcentage respectif des différentes zones de focalisation de la myoglobine purifiée après DEAE-cellulose et Sephadex G-50 est apprécié par densitométrie (voir fig. 2).

On ne note pas de différences significatives en ce qui concerne les pourcentages respectifs de ces trois zones principales de focalisation que l'on examine les protéines extraites à partir de porcs normaux ou exsudatifs, 15 minutes ou 4 heures *post-mortem*.

### 2.3. — *Comparaison des densitogrammes des myoglobines de porcs normaux et exsudatifs extraites 15 minutes après la mort de l'animal*

Quelques minutes après la mort de l'animal on compare les bandes de focalisation correspondant à la myoglobine des porcs normaux et exsudatifs : après coloration au bleu de Coomasie on observe une différence d'intensité significative au niveau de la bande de migration la plus anodique du pigment, bande caracté-

TABLEAU 3

*Comparaison des densitogrammes* ($\lambda = 595$ *nm*) *des myoglobines de porcs normaux et exsudatifs 15 minutes p.m.*

| pI des bandes de myoglobine . . . | pI = 7,0 | pI = 6,7 | pI = 6,5 |
|---|---|---|---|
| Porcs exsudatifs . . . . . | 39,7 ± 6,8 % | 22,9 ± 8,7 % | 37,4 ± 2,9 % |
| 15′ p.m. . . . . | $n = 5$ | 5 | 5 |
| Porcs normaux. . . . . | 41,6 ± 2,4 % | 25,9 ± 5,9 % | 32,6 ± 4,1 % |
| 15′ p.m. . . . . | 4 | 4 | 4 |
| t . . . . . | — 0,527 | — 0,586 | 2,065 |
| Ndl. . . . . | 7 | 7 | 7 |
| Δ p. 100 . . . . . | 4,8 | 13,1 | — 12,8 |
| Seuil de signification . . . . . | NS | NS | P = 7,7 % |

S : Significatif.
NS : Non Significatif.

risée par un point isoélectrique de 6,5 (tabl. 3). Les deux autres bandes de focalisation de la myoglobine, de comportement plus cathodique, dont les points isoélectriques sont égaux à 6,7 et à 7,0 ne semblent pas présenter de différence d'intensité significative.

La réaction peroxydasique de la myoglobine, obtenue après coloration à la benzidine, ne donne pas de résultats toujours identiques d'une préparation à l'autre quant à l'intensité de ces bandes. Cependant, sur un nombre restreint d'échantillons, l'examen visuel des plaques révèle que la bande de focalisation de pI = 6,5 est plus fortement colorée chez les porcs exsudatifs que chez les porcs normaux.

Ces observations suggèrent l'existence de différences au niveau des myoglobines des porcs normaux et exsudatifs non imputables à un effet dénaturant du couple bas pH — température élevée.

### 2.4. — *Comparaison des densitogrammes des myoglobines de porcs normaux et exsudatifs extraites à différents temps* post mortem

Après chute du pH *post-mortem*, dans une viande où la température est restée élevée, on n'observe plus de différence d'intensité entre les zones de focalisation des myoglobines de porcs normaux et exsudatifs (tabl. 4).

Si l'on compare les animaux exsudatifs entre eux et les animaux normaux entre eux on constate que, contrairement aux observations antérieures, il existe pour les animaux normaux une différence d'intensité au niveau de la bande la plus cathodique de la myoglobine de pI = 7,0 (tabl. 5).

L'étude de la microhétérogénéité du pigment musculaire conduira donc à des résultats différents selon que l'examen sera pratiqué avant ou après la chute du pH musculaire.

Nos résultats ne corroborent pas ceux de BEMBERS-SATTERLEE (1975) qui mettent en évidence des différences dans les points isoélectriques des myoglobines des porcs normaux et exsudatifs examinés plusieurs heures *post-mortem*. Cependant ces mêmes auteurs signalent le fait que, d'une préparation à l'autre, le point isoélectrique de la myoglobine de porc exsudatif variait de 6,29 à 6,69. Nous n'avons pas, en ce qui nous concerne, observé de telles variations entre nos différentes préparations. Ces auteurs confirment également l'instabilité de la myoglobine de porcs exsudatifs comparée à celle de porcs normaux mais ils n'en déterminent cependant pas la cause.

TABLEAU 4

*Comparaison des densitogrammes des myoglobines de porcs normaux et exsudatifs 4 heures p.m.*

| | pI | 7,0 | 6,7 | 6,5 |
|---|---|---|---|---|
| Porcs exsudatifs / Porcs normaux | t. . . . . | 0,801 | — 1,583 | 1,487 |
| | Ndl. . . . . | 5 | 5 | 5 |
| | Δ p. 100 . . | — 14,5 | 36 | — 10,7 |
| 4 h p.m.. . . . . | | NS | NS | NS |

TABLEAU 5

*Comparaison des densitogrammes des myoglobines de porcs normaux ou exsudatifs en fonction du temps p.m.*

| | pI | 7,0 | 6,7 | 6,5 |
|---|---|---|---|---|
| Porcs normaux 15′ p.m. / Porcs normaux 4 h p.m. | t. . . . . | 2,66 | — 1,38 | — 1,56 |
| | Ndl. . . . . | 5 | 5 | 5 |
| | Δ p. 100 . . | — 31,9 | 35,5 | 12,6 |
| | | 4,48 % (S) | NS | NS |
| Porcs exsudatifs 15′ p.m. / Porcs exsudatifs 4 h p.m. | t. . . . . | 1,512 | — 0,64 | — 1,46 |
| | Ndl. . . . . | 7 | 7 | 7 |
| | Δ p. 100 . . | — 16,6 | 12,6 | 9,89 |
| | | NS | NS | NS |

## Conclusion

Contrairement à certaines myopathies telles que les dystrophies musculaires observées chez d'autres espèces, comme chez l'homme en particulier (SHAPIRA G., DREYFUS J. C., 1958) nous n'avons pas enregistré de différence au niveau de la position des bandes de focalisation des différentes myoglobines de porcs.

Nos résultats sont à rapprocher des observations de LAURENT R. *et al.* (1961) obtenus après examen électrophorétique de myoglobines de rats. Ces auteurs constatent une inversion de l'intensité entre une bande lente et une bande rapide lorsqu'ils comparent des individus normaux à des individus myopathes.

La différence d'intensité que nous notons au niveau de la bande de migration du pigment de pI égal à 6,5, entre porcs normaux et porcs exsudatifs, pourrait s'expliquer comme le suggèrent SCHAPIRA G. et DREYFUS J. C. (1958) par une modification de composition protéique.

Avant toute dénaturation du pigment musculaire occasionné par le couple bas pH — température élevée, les différences d'intensité observées au niveau de la microhétérogénéité de ce pigment montrent que la bande de focalisation de pI = 6,5 pourrait servir de « marqueur » pour mettre en évidence les différences « natives ». Il pourrait s'avérer utile de compléter cette étude par l'examen d'animaux présentant un caractère exsudatif plus prononcé et par la purification du pigment musculaire obtenu à partir de muscle prélevé par biopsies sur l'animal vivant.

## Remerciements

Nous remercions l'équipe de G. MONIN pour avoir réalisé le test à l'halothane sur les animaux vivants.

## Summary

*Comparative study of the microheterogeneity of myoglobin from normal and PSE Pietrain pigs*

The aim of this study was to compare the microheterogeneity of normal and PSE pig's myoglobins. This work was carried out on ten pigs of the Pietrain breed, of 90 kg (± 3 kg) life weight.

The carcass were classified, on the one hand, according to the pH measured in the muscle fifteen minutes *post mortem* and, on the other hand, according to the halothane test carried out on the living animal.

Sarcoplasmic proteins, extracted from samples of the *Longissimus dorsi* muscle fifteen minutes and four hours after slaughtering, were purified by chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G 50.

The microheterogeneity of the sarcoplasmic proteins was examined by isoelectrofocusing on a polyacrylamid gel which was subsequently dyed with Coomasie blue and benzidine.

A significant difference in the pigment's microheterogeneity was observed between normal and PSE pigs immediately after slaughtering but not when myoglobin was extracted four hours *post mortem*.


## Références bibliographiques


Bembers M., Satterlee L. D., 1975. Physico-chemical characterization of normal and PSE porcine muscle myoglobins. *J. Food Sci.*, **40**, 40-43.

Brown W. D., 1972. Private communication to Dr. L. D. Satterlee. University of Nebraska, Lincoln, Nebraska.

Charpentier J., 1969. Influence de la température et du pH sur quelques caractéristiques physico-chimiques des protéines sarcoplasmiques du muscle de porc; conséquences technologiques. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9** (1), 101-110.

Charpentier J., Goutefongea R., 1963. Comportement électrophorétique des protéines sarcoplasmiques du muscle de porc normal et exsudatif. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **3** (4), 381-389.

Charpentier J., Goutefongea R., 1964. Electrophoretic characteristics of Lactic Deshydrogenase in Normal and Exsudative Pig muscle. *Nature*, **201**, 1325-1326.

Cheah K. S., Cheah A. M., 1976. The trigger for PSE condition in stress-susceptible pigs. *J. Sci. Fd Agric.*, **27**, 1137-1144.

Eikelenboom G., Minkema D., 1974. Prediction of pale, solf, exsudative muscle non-lethal test for the halothane-induced porcine malignant hyperthermia syndrome. *Tijdschr. Diergeneesk*, **99**, 421-426.

Haan A. M. F., 1953. Electrophoresis of the non structural proteins from normal and atrophic muscles of the rabbit and of man. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 258-269.

Laurent R., Deyfus J. C., Shapira G., 1961. Électrophorèse de myoglobines. Influence de la section nerveuse. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, 415-422.

Mc Loughlin J. V., 1963. The effect of rapid *post mortem* pH fall on the extraction of the sarcoplasmic and myofibrillar proteins of *post rigor* muscle. *Iroish. J. Agric. Res.*, **2**, 115-124.

Monin G., 1978. Communication personnelle.

Renerre M., 1977. Préparation rapide et sous forme non oxydée de la myoglobine des viandes de bovins, ovins et porcins. *Ann. Tech. Agri.*, **4**, 419-433.

Schapira G., Dreyfus J. C.,.1958. Électrophorèse des protéines musculaires solubles en milieu de faible force ionique. Souris normales et myopathes. *C. R. Soc. Biol.*, **152**, 1705-1707.

Schmidt G. R., Zuidam L., Sybesma W., 1971. Proc. 2nd int. Symp. Condition Meat Quality Pigs, Zeist, Pudoc, Wageningen.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (2), 191-209.

# Ecology of microflora in stored grain

R. N. SINHA

*Agriculture Canada, Research Station, 195 Dafoe Road, Winnipeg, Manitoba, R3T 2M9, Canada*

## Summary

Microflora of stored grain has been considered within the context of modern ecology and its three major subdivisions: population, community and ecosystem. The relationships of the cellular level of microflora as determined by their nutritional base, genotypic and environmental determinants are also examined. Illustrations of exponential and J-shaped growth curves of fungi occurring in both freshly harvested, and old stored cereals are given. Ecological succession in microfloral communities in stored grain of low and high moisture contents show different patterns of microfloral species; most preharvest microflora usually disappear during storage. Ecological energy pyramids, such as those illustrating the direction of energy flow and energy relations of a hypothetical wheat —*Alternaria*— *Gonatobotrys*, food chain are used to demonstrate the functional dynamics of man-made stored grain ecosystems. Characteristics of stored-grain ecosystems are described in terms of the ecosystem maturity concept as described by MARGALEF (1963). An integrated knowledge of microflora and associated abiotic and biotic variables is considered essential for proper management and long-term planning of post-harvest grain storage systems.

Key words: *ecology, microflora, storage, grain.*

## Introduction

Cereal grains, oilseeds and their products are vital ingredients of human diets and livestock feed. They are also a major source of raw materials for production of alcoholic beverages, starch, oil and other products. To survive and maintain an adequate standard of living in an already overpopulated world, man must produce and store billions of tonnes of grain each year. Unlike other precious possessions of man such as gold or platinum, food grain is a dynamic, living commodity which invariably undergoes quantity and quality loss during storage. The loss depends upon the length of storage, the storage conditions and the type of pests present. The main causes of stored grain spoilage are rodents, birds,

insects, mites, bacteria, yeast and fungi. Of these, arthropods and microflora can thrive in grain only between certain limits of moisture content and temperatures.

This report is concerned only with the ecology of microflora which involves the functional relationships of fungi, bacteria, yeast and actinomycetes within the man-made and fluctuating stored grain environment. An analysis of control mechanisms in the stored grain environment will be a part of the presentation. The ecology of microflora will be considered from three aspects representing the three major divisions of modern ecology: population, community and ecosystem.

The microbial organisms and animal pests which occur in cereals, oilseeds and their products operate within specific limits imposed upon them by their genotype and environment, mainly dominated by climate. Climate sets the basic limits

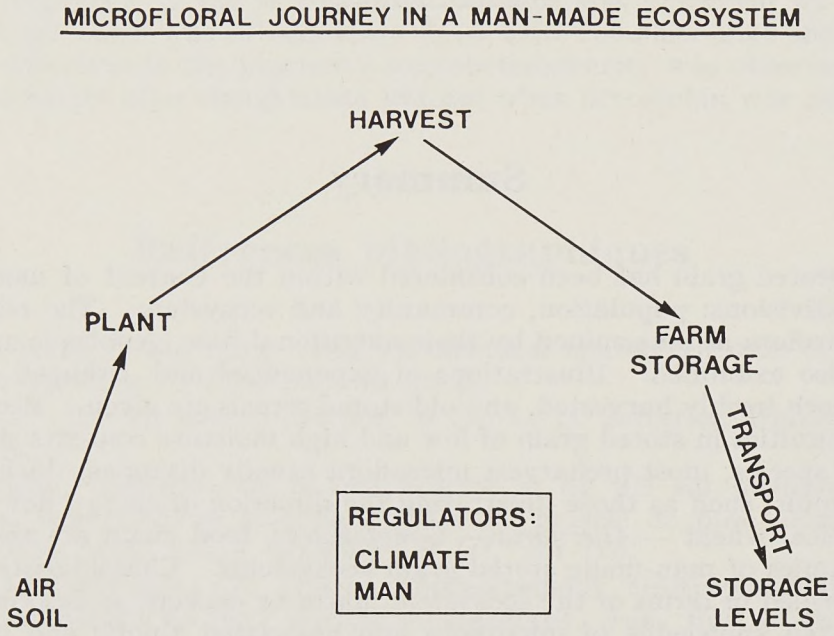



FIG. 1. — *A schema showing the directions of microfloral journey from their source in air and soil to post-harvest system.*

within which food plants are grown, harvested, stored and distributed. The causes and effects of microbial infection or contamination of foodstuffs are complex. Both the grain (live but dormant seed of a crop species) and the air-borne or soil-borne organisms that attack it have characteristic properties that are affected by many physical, chemical, biotic and man-made variables. To appreciate the food quality and its present and potential utilization value, intercorrelations must be established among these variables as they relate to the general properties of the grain itself (MULTON *et al.*, 1973; SINHA, 1973). The complexity of the situation can be realized from the following example: A crop of home-grown maize in France may be combine-harvested with high initial moisture, infected by bacteria, yeast, fungi and mites, dried in a batch drier, stored in a concrete silo, subsequently infested by insects, fumigated, transported by trucks to potential distributors, and finally to human or livestock consumers. The sequence of a microfloral jouney in a man-made ecosystem is shown in figure 1.

Climate and man have the role of key regulators. Climate is defined as the mean physical conditions that have a major effect on the mean population density of a species. Climate, of course, with or without interference from man, affects

the quality of stored grain directly by acting on seed properties, and indirectly by influencing harvest and storage conditions (e. g. dry or damp grain storage), and the rate of increase of microflora and other biotic agents which live on grain (fig. 2). Under the influence of the same climate, microflora attack or remain dormant and may change sexual stages while being associated with plant or plant debris, soil or air. Man's role in managing the grain harvest and storage system is well-known.

Although several comprehensive reviews are written on the ecology of microflora in stored grain (SEMENIUK, 1954; PANASENKO, 1967; CHRISTENSEN and KAUFMAN, 1969), most of these deal with the physical limits (particularly temperature and moisture) of individual microorganism with regard to two major and one or more secondary abiotic variables such as relative humidity, temperature, $O_2$-$CO_2$ level, pH (PANASENKO, 1967), and odor formation (STAWICKI *et al.*, 1973; RICHARD-MOLARD *et al.*, 1976). Such investigations, usually carried out under controlled laboratory conditions, have been useful. They are, however, a part of the microbial *autoecology* which is the study of individual species in relation to

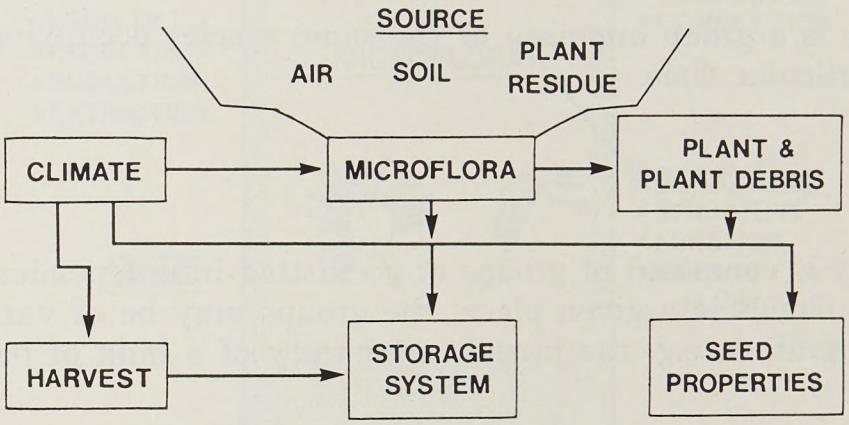



FIG. 2. — *A schema showing the source of microflora and the overall influence of climate on seed and its properties as well as on microflora, as the crop is harvested and passed through the storage system.*

environmental conditions; distinct from *synecology*, the study of various populations and groups of species in relation to their total environment. More relevant to actual grain storage conditions, the latter includes population, community, ecosystem and energy flow concepts. To obtain meaningful results, a study of post-harvest grain storage systems must be conducted within the framework of well-established ecological theories. Unfortunately, this "holistic" approach is used by few grain storage microbiologists. Before dealing with interrelations of fungi and other microflora of stored grain, I shall define several terms and explain the key concepts of modern ecology.

## *Ecology*

This term was originally coined by Ernst Haeckel in 1869. Ecology is a methodical study of the interactions that determine the distribution and abundance of organisms. Theoretically, it is a study of the environment for exploring evolutionary processes. The ecologist asks three questions: what, how and why,

as he tries to cope with three well-defined problems. These are: (1) dynamics within a given environment; (2) functional relationships among organisms; (3) control mechanisms in the ecosystem.

## *Levels of Organization*

An ecologist has to work with one or more of the following levels or organization: individual → population → community → ecosystem biome → biosphere. The radiant energy from the sun is used in the photosynthetic process of the green plant whereby $CO_2$ is assimilated into energy-rich carbon compounds. The plant also uses nutrients from the soil and these minerals are cycled and recycled as part of biogeochemical cycling. Thus, energy from both sources is transferred from one type of living organism to another, allowing a wide variety of plants and animals to live, propagate and decay in an orderly manner.

### *Population*

Population is a group organism of the same species occupying a particular space at a particular time.

### *Community*

Community is composed of groups of coexisting interdependent populations of plants and animals in a given place; the groups may be of various sizes and degrees of intergration, e.g. the fungal community of a bulk of barley in a bin.

### *Ecosystem*

Ecosystem is the biotic community and abiotic environment, e.g. communities of microflora, insects and mites as they live together and respond to the changing temperature and relative humidity of the air. Ecosystem may also be defined as an assembly of interlocking life systems.

### *Biome*

Biome is composed of regional ecosystems; all biomes together make the earth's single biosphere.

### *Life system*

Life system is a practical concept recently developed by Clark *et al.* (1967). It is that component of an ecosystem that determines the existence, abundance and evolution of a population. Such a system has a subject population and its effective environment which is composed of the totality of external agencies affecting the population. Interlocking life systems make up the framework of an ecosystem.

*Ecology of Microflora*

To fully understand the ecology of microflora of stored grain, one must study these organisms at all levels of organization using the basic principles of all the three branches of modern ecology (fig. 3). The population process and attributes of individual species should be examined on the basis of available data on the biotic potential, size, growth, regulation mechanisms (environment resistance),

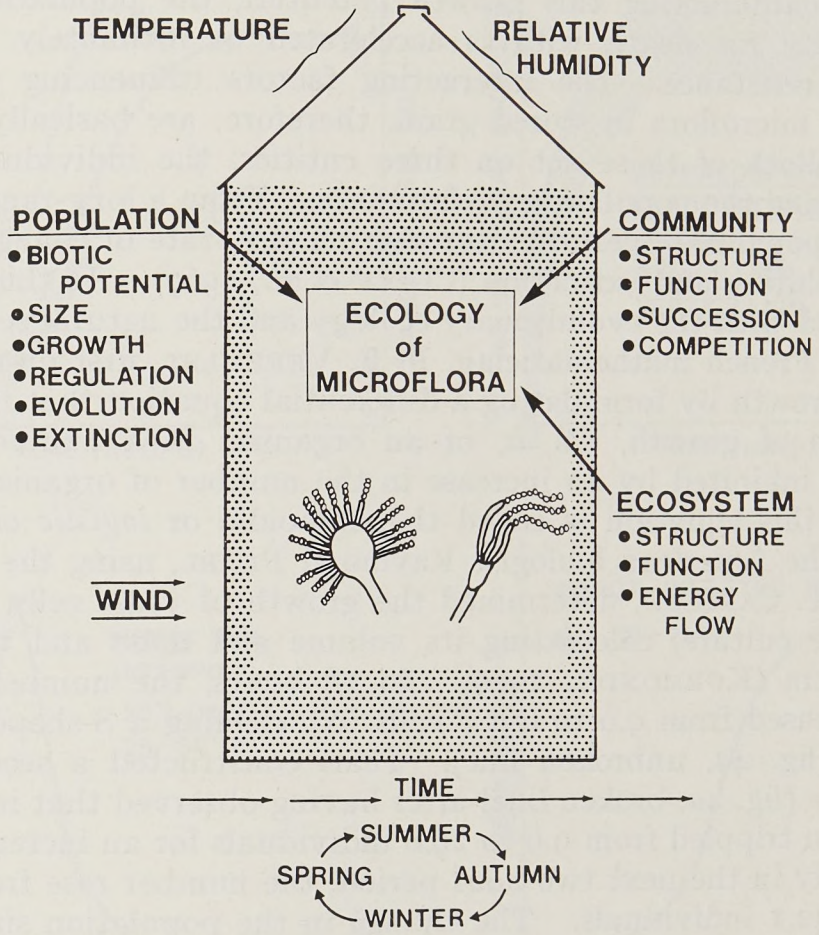



FIG. 3. — *A schema illustrating the " holistic " approach for the study of microfloral ecology in stored crops. The diagram shows the 3 sub-disciplines, seasonality and the major abiotic variables which should be considered in a ecological study.*

evolution and extinction of the species. The microfloral community comprising various species of fungi, yeasts and bacteria associated with the stored grain mass should be examined in the light of our knowledge of the community structure (physical relationships of species), function, ecological succession and relationships with other organisms belonging to overlapping communities. Finally, all these components can be integrated through the study of the post-harvest stored grain ecosystem. Because the ecosystem is a real entity in which the abiotic, physicol-chemical environment and the biotic assortment of plant and animal-like forms interact in a basically energy-dependent way, a study of the structure, function and energy flow within it has to be undertaken to learn about the impact and consequences of the microfloral invasion of stored grain.

## *Population Ecology o Microflora*

Population is a unit of study comprising a group of individuals of the same species occupying a certain space at a particular time. The population has statistically measurable group characteristics. These are: size (density, growth rate or mobility), death rate (or mortality), immigration and emigration. The last two are not often relevant to immobile microflora. When conditions are ideal, a microfloral species population will increase in geometrical progression. The biotic potential for such an increase at a given rate is inherent in the genotype of the species. Counteracting this growth potential, the population also has an inherent capacity for death with is accelerated or ultimately determined by environmental resistance. The interacting factors influencing the population performance of microflora in stored grain, therefore, are basically genotype and environment. Both of these act on three entities: the individual (phenotype), the population, and the population performance. From a long-range evolutionary viewpoint, the population performs through its size, rate of change (growth rate), persistance, evolution and extinction (Clark *et al.*, 1967). In this paper, we will not be concerned with the evolutionary ecology and the natural selection process.

In 1838, a French mathematician, P. F. Verhulst, first discovered the law of population growth by formulating a differential equation that includes the instantaneous rate of growth, $dN/dt$, of an organism in a limited environment. Such growth is inhibited by an increase in the number of organisms themselves. When plotted, this equation is called the sigmoidal or *logistic curve*. Nearly a century later, the American biologist Raymond Pearl, using the data of a German scientist, T. Carlson, determined the growth of yeast cells by periodically centrifuging the culture, calculating its volume and mass and then expressing them in numbers (Kormondy, 1969). In 18 hours, the number of individual yeast cells increased from 9.6 to 661.8 cells (N) yielding a S-shaped or sigmoidal growth curve (fig. 4*a*, unbroken line). Pearl constructed a second curve, the *growth rate curve* (fig. 4*a*, broken line) after having observed that in two hours the yeast population trippled from 9.6 to 29.0 individuals for an increase of 19.4 individuals, similarly in the next two-hour period, the number rose from 29.0 to 71.1 an increase of 42.1 individuals. The change in the population size of yeast was symbolized as $\Delta N$ —the Greek symbol for delta representing change— in a passage of time symbolized as $\Delta t$. This was derived directly from plotting the observed data. The curve has four components, the lag or slow acceleration period, the exponential increase period (= logarithmic phase), the deceleration period, and the stationary (or in equilibrium with the environment) period. When the environment can support the population or it has the "*carrying capacity*", the last phase can be achieved. When the environment changes, *viz* through change in temperature or moisture content of the substrate, or production of toxic substances, this carrying capacity of the microfloral population also changes and another stationary phase is established. The equilibrium period, of course, includes both addition of population by asexual reproduction (*natality*) and loss of individuals by natural death (mortality). These two processes, however, remain in balance allowing no net change in the population. As a rule, natality pushes the sigmoidal growth curve up and mortality pushes it down (fig. 4A). Although the population growth observed in the laboratory cultures in many species and during the initial stages of growth in most species often show a sigmoidal growth curve, many species of microflora of stored grain, when observed in the natural prehar-

vest, harvest and post-harvest storage conditions, yield another type of curve: a J-shaped growth curve. This curve was obtained with a population of *Aspergillus flavus* in a heating damp grain pocket with a 13-ton wheat bin in Manitoba, Canada (SINHA and WALLACE, 1965, fig. 4C). The population increased at an accelerating rate, and then instead of levelling off, it precipitiously decreased its rate to zero by a large population die-off caused by fungus-induced 64 °C tempe-

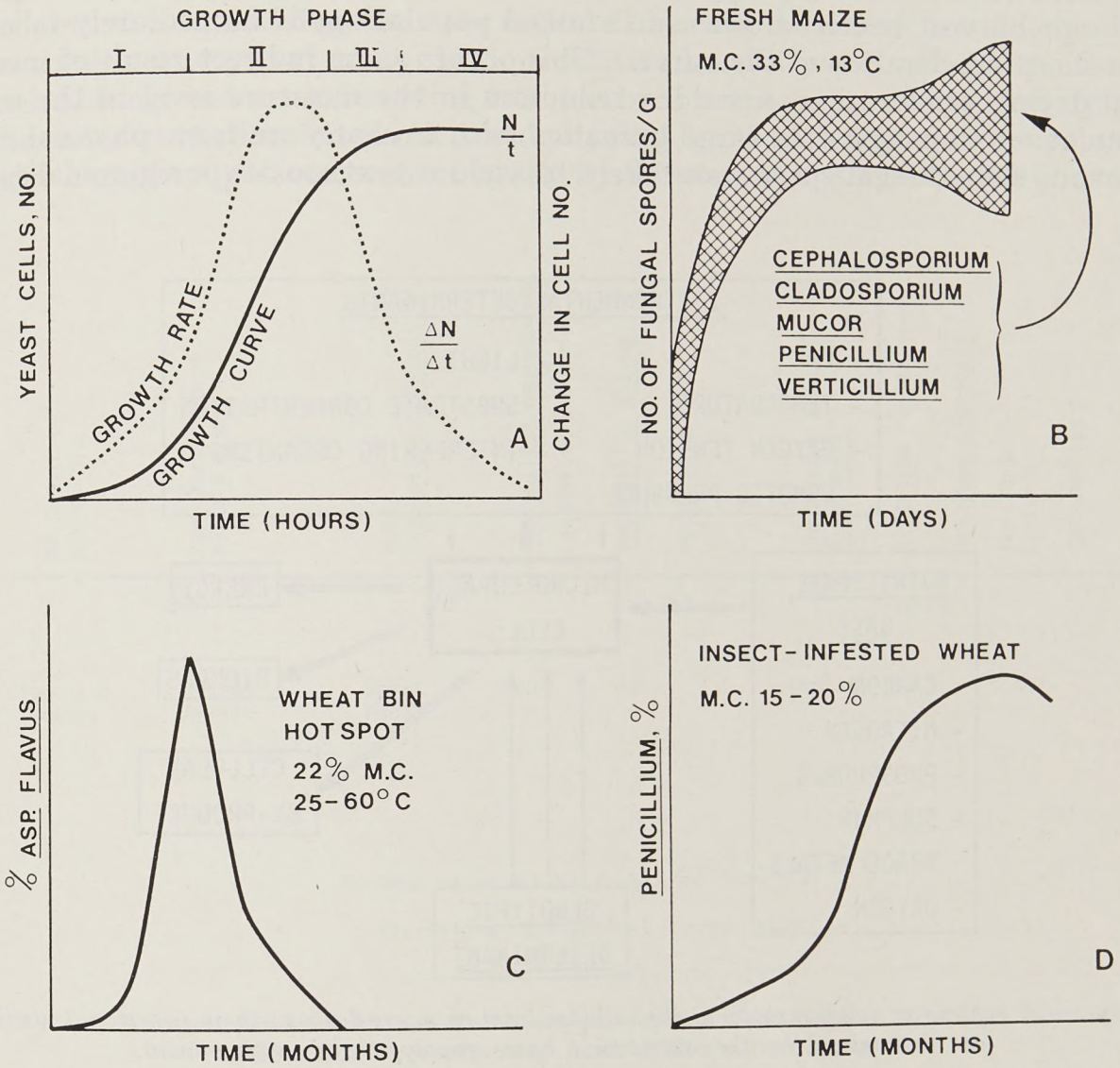



FIG. 4. — *A schema of growth curves observed in the study of population ecology of microflora.* (A) *The classical growth and growth rate curves of yeast cells* (PEARL, 1926); *I. — Lag; II. — Exponential; III. — Deceleration, and IV. — Stationary phases of a growth curve.* (B) *Growth curves of fungi associated with freshly harvested maize* (CAHAGNIER and POISSON, 1973). (C) *J-shaped growth curve of* Aspergillus flavus *showing abrupt population drop-zero rate* (SINHA and WALLACE, 1965). (D) *The classical growth curve shown by* (Penicillium *growing on stored wheat* (BRONSWIJK and SINHA, 1973).

rature. In France, J-shaped fungal growth curves showing unrestricted, and rapid exponential growth (without a lag period) up to the limit of environment was recorded by CAHAGNIER and POISSON (1973) for *Cephalosporium, Cladosporium, Mucor, Penicillium, Verticillium* in a freshly harvested wet maize crop (fig. 4B). In this case, the experiment was terminated before any major environmental shift could occur, such as thorough, sudden drying or chilling of the substrate or grain. Thus, the fallen population did not occur as in the case of *A. flavus* described above.

In Canada, a sigmoidal growth curve (fig. 4D) similar to that of PEARL's based on yeast cells was observed with *Penicillium cyclopium* invading wheat initially stored dry in a metal drum. The grain was subsequently dampened by the metabolic moisture released by the prior infestation of granary weevils and red flour beetles (BRONSWIJK and SINHA, 1971). The J-shaped curves are common in the growth of annual plants which are killed as the photoperiod changes when winter sets in. The growth pattern of fungi in stored maize, barley or wheat, that were harvested wet, show a J-shaped curve. The lag-free exponential growth phase of the preharvest bacterial, yeast and fungal populations is immediately followed by a sharp deceleration of the curve. This occurs as an indirect result of mechanical drying which causes a sudden reduction in the moisture level in the intragranular environment. In large granaries with a nearly uniform physical environment, some fungal species are likely to yield a textbook-type sigmoidal curve.

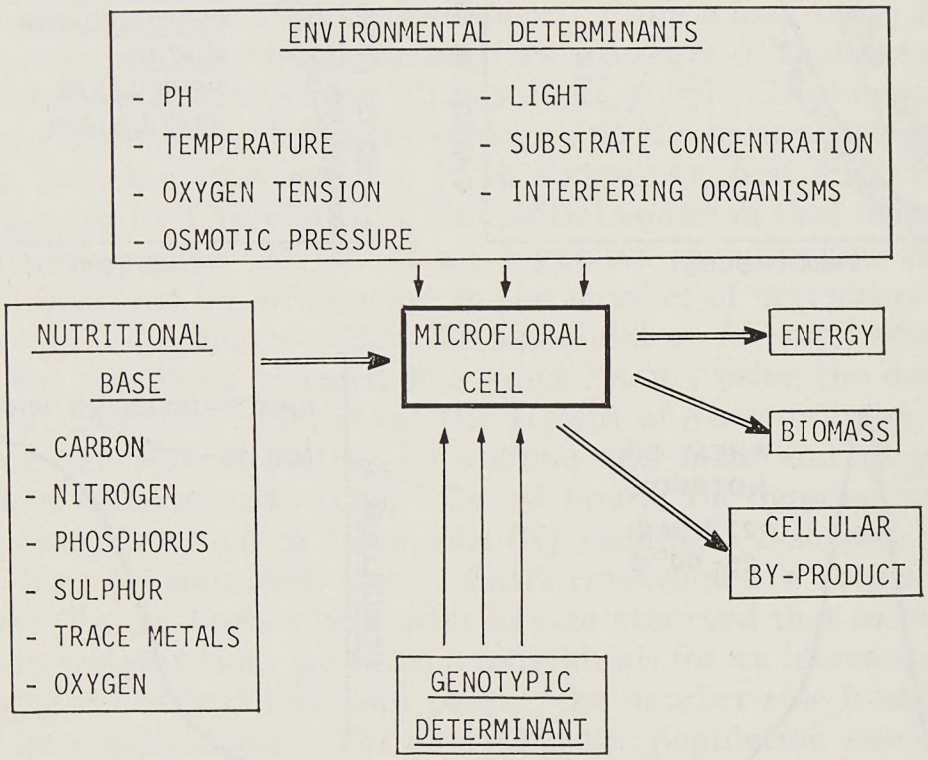



FIG. 5. — *A schema of relationships at the cellular level of microflora as their functional attributes are determined by the nutritional base, genotype and environment.*

Because more studies of population growth in post-harvest microbial storage species have been done in the laboratory for short periods with artificial nutrients, the typical growth curves of these species in real granary conditions have not yet been established. It should be noted that the type of environmental resistance required to slow down the initial exponential phase of the common fungal species, *Penicillium* and *Aspergillus*, varies from species to species and species-group to species-group such as psychrophiles, mesophiles and thermophiles. The variety of antibiotics and toxins produced by various species, antagonism, crowding and competition among them will greatly influence the shape of the last phase of the growth curve of these species. Growth kinetics of mycelial fungi has been recently reviewed by RIGHELATO (1975).

Each species of microflora has a biotic potential, such as its *intrinsic* rate of natural increase under optimal and suboptimal conditions. This potential is

determined by its genotype which has evolved through mutation and evolution through natural selection (fig. 5). This species-specific biotic potential determines whether the initial population growth will yield a J-shaped or a S-shaped curve. It also determines the physical limits within which a particular species population will survive, grow, and reproduce (sexually or asexually), or do all these in response to a particular environmental stress. Considerable information has been gathered on the physical limits (including tolerance to chemical conditions) of most major species of storage fungi and some bacteria and yeasts. The latest review summarizing the data collected by various researchers on the minimum water activity ($a_w$) or equilibrium relative humidity required (ERH) for the growth of fungi and yeast-invading food has been prepared by Corry (1978) (fig. 6). Earlier reviews that included microbial physical limits with regard to temperature, relative humidity, pH, etc. were compiled by Semeniuk (1954), Panasenko (1967),

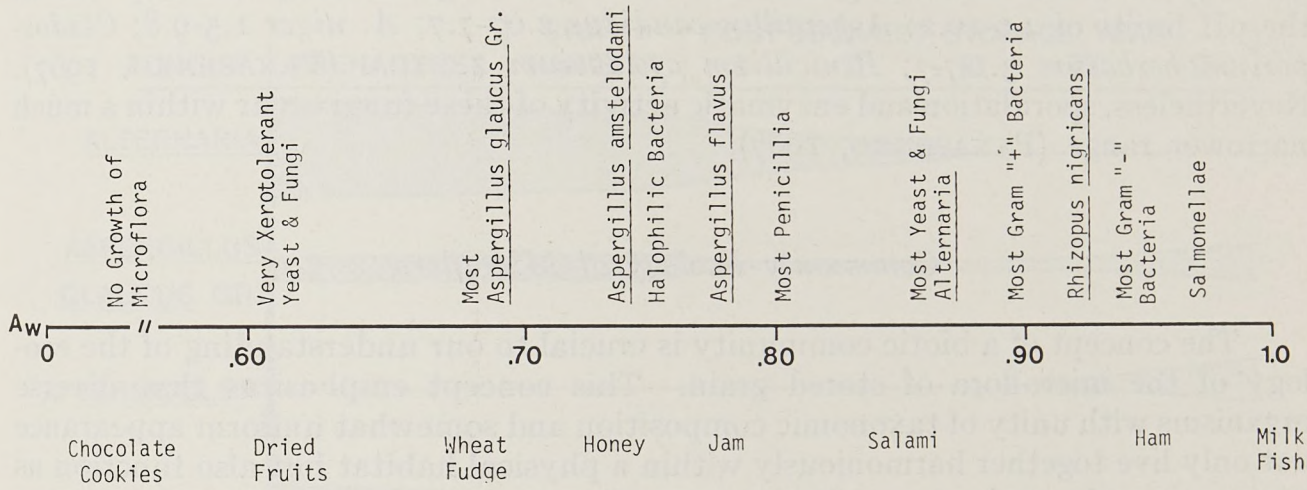



Fig. 6. — *A schema of minimum water activity* ($a_w$, *equilibrium relative humidity*) *of microflora and several typical stored foods* (After Corry, 1978).

and Martin and Gilman (1976). These reports, while providing valuable data on the biotic potential and physical limits of storage microflora, do not make any serious attempt to correlate such findings to establish principles and concepts of modern ecology.

Persistence in the seed is an important characteristic of fungal population performance. Dematiaceous subepidermal mycelium was usually found in clean wheat grains at harvest in samples collected from all parts of the world (Hyde and Galleymore, 1951). Although the quantity of mycelium differed greatly, the degree of infection, rated over a 10-point scale, was proportional to the atmospheric relative humidity. Christensen and Kaufman (1969) also recorded dormant mycelium of the following fungi: *Alternaria, Aureobasidium, Cladosporium, Helminthosporium,* and *Fusarium* from dry wheat pericarps. The long-term study of dry (13-15 p. 100 moisture content, wet basis) stored grain conducted

by SINHA *et al.* (1969), WALLACE *et al.* (1976) and PIXTON *et al.* (1975) also revealed the persistence of both preharvest fungi such as *Alternaria*, and *Cladosporium*, and post-harvest fungi such as *Penicillium cyclopium*, and *Aspergillus versicolor*. French mycologists POISSON (1972), PELHATE (1974) and others have also found the similar persistence of microflora in stored maize, wheat and barley harvested at high moisture and stored with or without chemical preservatives.

CHRISTENSEN (1978) has summed up the temperature limits of post-harvest fungi as those growing between 5 and 45 °C with an optimum range of 25-30 °C. The water activity or the relative humidity range lies between 65 and 90 p. 100 RH ($a_w$ of 0.65 to 0.90). Characteristically, *Aspergillus restrictus* and *Wallemia sebi* grow only on grain and grain products with 68 to 75 p. 100 relative humidity. AYERST (1969) has given a good summary of the ranges of moistures that permit the growth of many common stored-grain fungi. This useful work was, however, done in the laboratory using dried agar strips which is quite different from fungi growing on cereal seeds in granaries. Most stored grain fungi develop within the pH limits of 2.0-10.2; *Aspergillus candidus* 2.07-7.7; *A. niger* 1.5-9.8; *Cladosporium herbarum* 3.1-7.7; *Penicillium cyclopoium* 2.0-10.0 (PANASENKO, 1967). Nevertheless, sporulation and enzymatic activity of these fungi occur within a much narrower range (PANASENKO, 1967).

## *Community Ecology of Microflora*

The concept of a biotic community is crucial to our understanding of the ecology of the microflora of stored grain. This concept emphasizes that diverse organisms with unity of taxonomic composition and somewhat uniform appearance not only live together harmoniously within a physical habitat but also function as a group in a dynamic way. Such an assemblage of a population has its characteristic trophic organization, and metabolic pattern (ODUM, 1971). The best way to control a particular organism, such as mycotoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in a stored grain ecosystem, would be to modify the microfloral community instead of trying to attack the organism singly and directly. Because man arbitrarily superimposes his culture and management practices on plant and animal communities and ecosystems, his ultimate well-being depends largely on how well he understands the workings of such systems and manipulates them to his advantage.

Most studies on the ecology of the microflora of stored grain that have been conducted so far involve a description of the community structure (species diversity or kinds of microbial species and their succession) at one time, or occasionally including seasonal and annual variation. For example, LAGRANDEUR and POISSON (1968) and LUTEY and CHRISTENSEN (1963) demonstrated a succession among preharvest (field) fungi and post-harvest (storage) fungi similar to that observed in the development of various « series » (= sequence of stages that follow one another in an ecological succession) towards a climax (= final stage of succession that permits the organism to live on in a balanced environment); a climax containing plants and animals. Their regular sampling of maize from harvest time through post-harvest storage showed that the field fungi died off and made room for the post-harvest storage fungi. At the end of the storage period, only *Penicillium cyclopium* and *P. chrysogenum*, and *A. versicolor* remained.

Similar succession of microflora associated with two 13.6-tonne farm-stored bulks of wheat was demonstrated by our group in Manitoba during an 8-year

study of the fungal community. Using both descriptive (WALLACE *et al.*, 1976) and multivariate statistically analysis (SINHA *et al.*, 1969) we found that *Alternaria* and its associates *Gonatobotrys, Cochliobolus* and *Nigrospora,* which are carried within seeds from the field, gradually disappear and are replaced by *Aspergillus versicolor, A. glaucus* Gr., *A. candidus, Penicillium,* spp., *Absidia, Chaetomium, Rhizopus,* and *Streptomyces.* Interrelations among fungi and between some fungi and some insects and mites in grain bulk ecosystems were confirmed statistically.

MOUBASHER *et al.* (1972), found that the common granary species of *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* and *Alternaria* alternate their dominance pattern according to the substrate, length of storage and treatment of grain. At a moisture content below 15 p. 100 *Aspergillus niger* was dominant in wheat, maize and sorghum. At higher moisture levels, *A. niger* was replaced in time by *P. citrinum,* and *A. sydowi* on wheat; by *P. citrinum* and *A. terreus* on maize; and by *A. terrus*

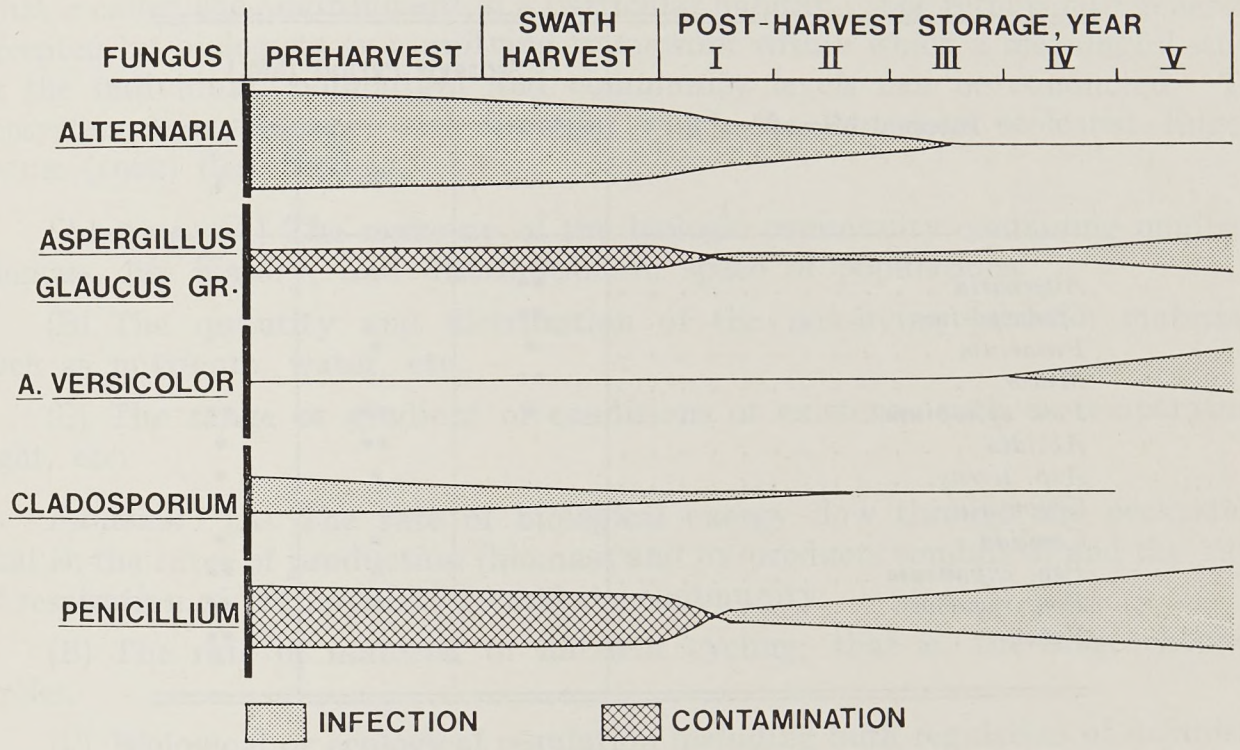



FIG. 7. — *A schema of the degree of contamination and infection of cereal seeds by several major fungi during preharvest, harvest and post-harvest (up to 5 yr) periods.*

on sorghum. At a higher moisture content and 8 °C temperature *Penicillia* seemed to dominate. *A. ochraceus* was a preferred fungus on wheat.

FLANNIGAN (1978) has found considerable preharvest contamination of barley and wheat grain by *Penicillium, Aspergillus* and other fungi. He observed that when combine-harvested barley and wheat were plated directly on malt salt agar up to 250 times more kernels were contaminated by xerophilic *Penicillium* spp. than when the same crop was hand-threshed. Both crops, however, contained similar levels of *Aspergillus glaucus* Gr. He concluded that soil and residues in the combine harvester, sacks used in bagging and, by direct plating, vegetative parts of the plants were possible sources of contamination occurring during combine harvesting.

The pattern of the association and infection of seeds from preharvest, through the post-harvest storage period for several years has been illustrated in figure 7.

Contamination, infection or both of *Alternaria, Cladosporium, Aspergillus glaucus* and *Penicillium* seems to accompany grain from the preharvest period through the early phase of post-harvest storage. In storage, preharvest fungi gradually disappears and the contamination of *Penicillium* gradually and steadily turns into infection as years pass. In their study of the ecological succession of moist, stored barley in a partially sealed silo, MULINGE and CHESTERS (1970) have also found this type of succession of internal seed microflora. Table 1 shows that

TABLE 1

*Ecological succession of internal microflora of wet harvested barley (19-53 p. 100 moisture content) stored in a partially-sealed concrete silo in Cumberland, U.K. The number of asterisks indicates degree of ecological dominance. Asp.* = Aspergillus, *Pen.* = Penicillium (MULINGE *and* CHESTERS 1970)

| Internal Microflora | Storage Period (Mo.) | | |
|---|---|---|---|
| | 0 | 2 | 4 |
| *Alternaria* | ** | | |
| *Cladosporium* | ** | | |
| *Fusarium* | * | * | |
| *Mucor* | ** | | |
| *Pen. cyclopium* | * | ** | ** |
| *Absidia* | | ** | * |
| *Asp. terrus* | | * | * |
| *Cryptoceus* | | | * |
| *Candida* | | * | * |
| *Pen. expansum* | | * | ** |
| *Pen. roqueforti* | | * | ** |
| Yeasts | | | ** |

*Alternaria, Cladosporium* and *Mucor* predominate the incoming grain. In two months, *Penicillium cyclopium* and *Absidia*, and in four months *P. cyclopium, P. expansum, P. roqueforti* and yeasts become dominant microflora.

In England, LACEY (1971) described a typical microbial succession in barley with 25-58 p. 100 moisture content stored in six top-unloading, unsealed concrete-slaved silos in six farms. The grain at the top became increasingly heated and turned mouldy as the unloading process was slowed down. A characteristic succession of fungi and actinomycetes developed. At an unloading rate of about 7.5 cm per day, only yeasts such as *Endomycopsis chodatii* WICKERHAM and *Hansenala* (HANSEN) H. and P. SYDOW, were abundant, but *Penicillum* spp. became common at a slightly slower rate of unloading. With further slowing of unloading both these groups of microflora became scarce and were replaced by *Absidia* spp. and *Mucor pusillus* Lindt, then *Aspergillus fumigatus* Fres., *Humicola lanuginosa* (GRIFFON and MAUBLANC) BUNCE, *Micropolyspora faeni* Cross, MACIVER and LACEY; and *Thermoactinomyces vulgaris* TSIKLINSKY appeared as the grain temperature rose.

There is a real and potential health hazard in handling, transporting, and

consuming stored grain which underwent enormous qualitative and quantitative changes. LACEY (1971) reports that without disturbance, the silos contained $10^6$-$10^7$ air-borne spores /$m^3$ air, but when mouldy grain was unloaded, concentrations rose to a maximum of 2 860 $\times$ $10^6$ spores /$m^3$ of air; over half of these were bacteria and actinomycetes and one-quarter *Aspergillus flavus* Link.

To my knowledge no comprehensive work on the community function (metabolism and energy transfer) is available to explain the complete role of the microbial community associated with aging and decaying grain stored in granaries.

## *Stored Grain Ecosystem and Its Microfloral Component*

The term ecosystem as a unit of ecology was first proposed by the British ecologist, TANSLEY, in 1935 as a name for the interaction system comprising the organism complex together with the whole complex of physical factors forming what is called the environment in a particular habitat. The term is now generally accepted by biologists as a unifying framework within which a meaningful study at the individual, population and community levels can be conducted. The ecosystem has structure and function which the American ecolostist Eugene ODUM (1962) described as:

*Structure:* (A) The make-up of the biologic community containing numbers, biomass, life history, and distribution in space of populations.

(B) The quantity and distribution of the non-living (abiotic) materials, such as nutrients, water, etc.

(C) The range or gradient of conditions of existence such as temperature, light, etc.

*Function:* (A) The rate of biological energy flow through the ecosystem, that is, the rates of production (biomass and by-products combined) and the rates of respiration of the populations and the community.

(B) The rate of material or nutrient cycling, that is, the biogeochemical cycles.

(C) Biological or ecological regulation including both regulation of organisms by the environment (e.g., as in photoperiodism), and regulation of the environment by organisms (e.g., as in nitrogen fixation by microflora).

Such descriptions are, of course, arbitrary, but they have been convenient in understanding the whole system and developing a general theory. Ecology of microflora in stored grain can be more clearly understood within the framework of such a unifying theory. In 1963 the SPANISH ecologist, Ramon MARGALEF, divided all world ecosystems into two broad categories in terms of the " maturity " level, which is a quantitative measure of the pattern in which the components of the ecosystems are arranged and related. Although there are all types of intergrades, an ecosystem can either have a complex structure (many species with involved relationships), rich in interrelations, and needing a low amount of energy to maintain it; or it has a simple structure, poor in interrelations and requiring a large amount of energy for mainenance. The former is a mature ecosystem that changes in a progressive and directional way towards maturity and stability in an environment that has low disturbance from outside. Examples are tropical rainforests in Brazil, and the coral islands. The simpler structure is a characte-

ristic feature of an immature ecosystem that changes in an unpredictable way and rarely attains maturity and stability mainly because of strong and persistant disturbances coming from outside the system; e.g. an agricultural ecosystem with field crops, or a stored grain ecosystem. To sum up, the characteristics of the two types of ecosystems are given in Table 2.

TABLE 2

*Basic characteristics of immature and mature ecosystems* (After to MARGALEF, *1963*)

| Attribute | Ecosystem State | |
|---|---|---|
| | Immature | Mature |
| *Environmental disturbance* | strong | weak |
| *Structure:* | | |
| Biomass | small | large |
| Species diversity | low | great |
| Stratification | few | many |
| *Energy flow:* | | |
| Food chains | short | long |
| Primary production per unit biomass | high | low |
| *Individual and species:* | | |
| Fluctuations | high | low |
| Life cycles | simplified | complex |
| Food intake relations | generalized | derived |
| Size of organism | smaller | larger |
| Individual longevity | low | high |
| *Population:* | | |
| Control mechanisms | abiotic | biotic |
| *Man's exploitation:* | | |
| Benefit in yield | substantial | low |
| Resilience | high | low |

If we now examine the characteristics of the species of fungi, yeast and bacteria or those of the microbial and arthropod communities occurring in a stored grain ecosystem we find that through their attributes this type of ecosystem fits well with the description of an immature ecosystem.

A granary filled with a stored crop is a man-made immature ecosystem with a relatively simple structure and a non-regenerating energy supply. The solar energy, captured by the carbohydrate-producer, chlorophyl bearing cereal plants (producers or autotrophs as part of a preharvest agroecosystem, fig. 8) through the photosynthetic process, is concentrated in seeds along with mineral nutrients collected by the roots from the soil and are gradually used to maintain the post-harvest stored grain ecosystem (fig. 9). Because of frequent and often strong

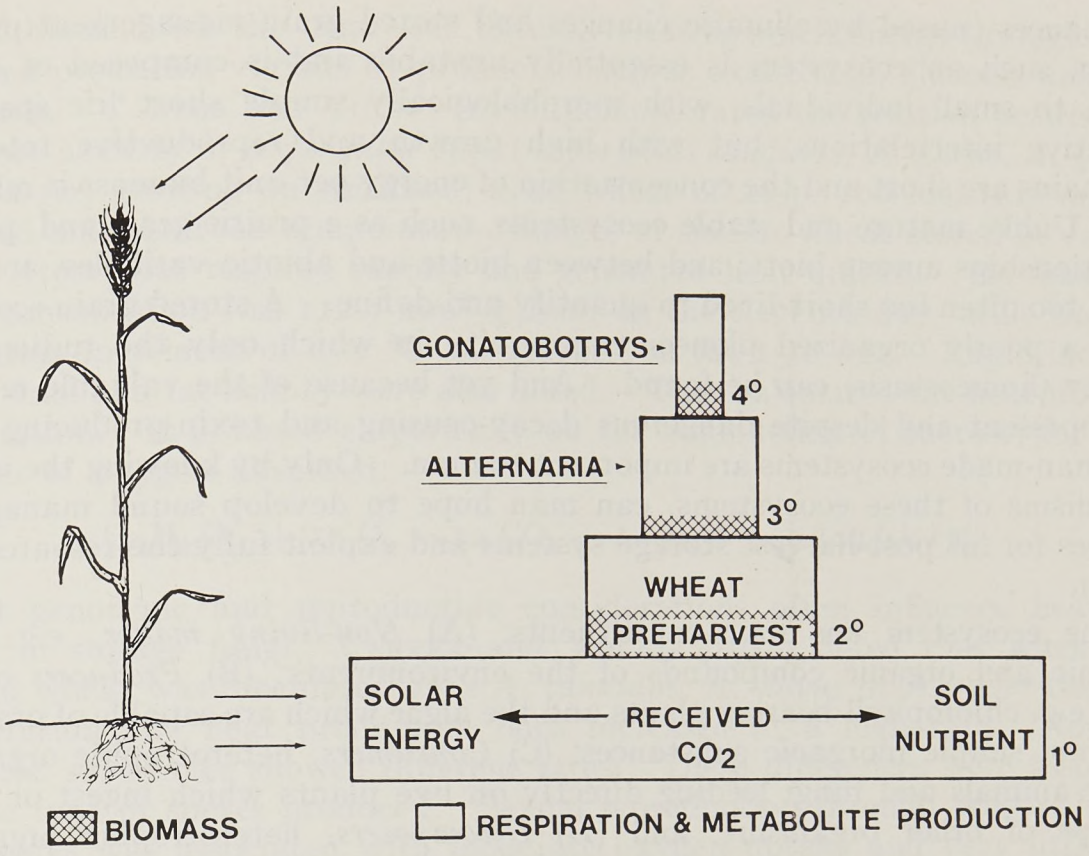



FIG. 8. — *An ecological energy pyramid illuztrating energy relations of a hypothetical wheat* —Alternaria— Gonatobotrys *food chain. The source, solar energy from the sun is passed through the wheat plant to the various trophic levels* ($1^0$-$4^0$) *of this food chain.*

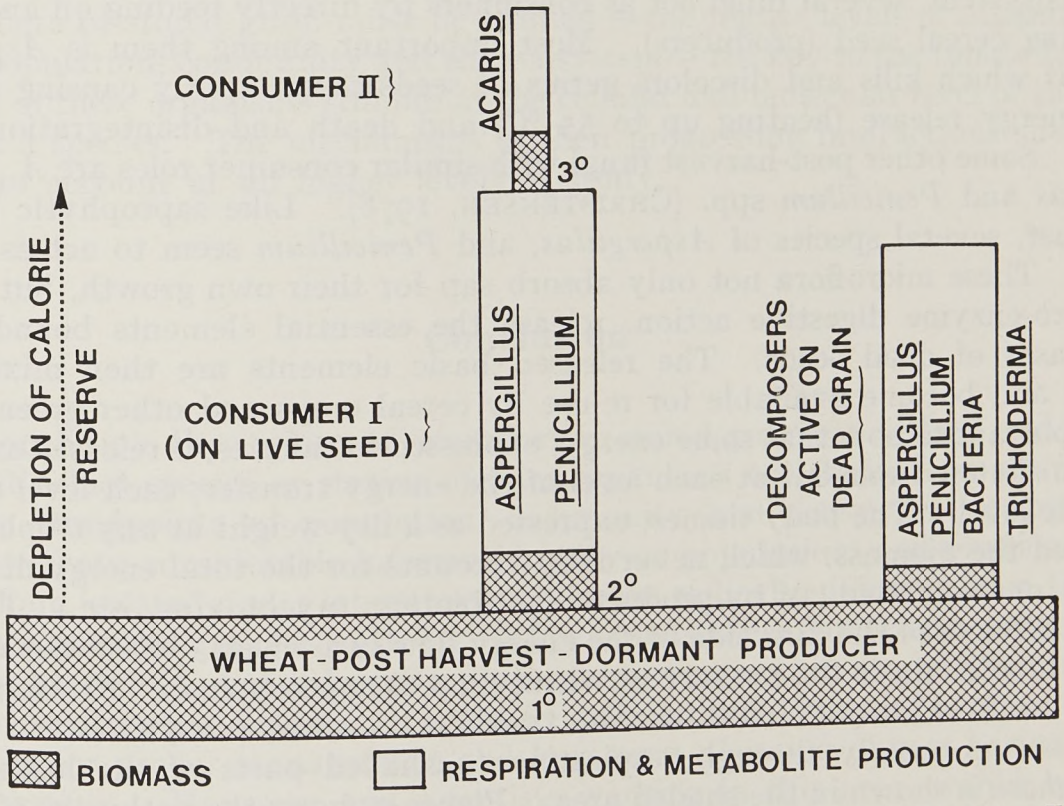



FIG. 9. — *A schema of ecological energy pyramid involving post-harvest grain storage. The shaded area indicate that position of the total energy flow which is fixed as organic biomass and is potentially available as food for other populations in the next trophic levels* ($2^0$, $3^0$.,,,). *The unshaded portion in each tier indicates energy dissipated through respiration, heat and metabolic production.*

disturbances caused by climatic changes and stored grain management practices of man, such an ecosystem is essentially unstable and is composed of species, minute to small individuals, with morphologically simple short life spans and facultative interrelations, but with high growth and reproductive rates. Its food chains are short and the concentration of energy per unit biomass is relatively high. Unlike mature and stable ecosystems, such as a prairie grassland, patterns of relationships among biotic and between biotic and abiotic variables, are vague and all too often too short-lived to quantify and define. A stored grain ecosystem is like a poorly organized pioneer community in which only the rudiments of stability (homeostasis) can be found. And yet because of the valuable resources they reprssent and despite dangerous decay-causing and toxin-producing microflora, man-made ecosystems are important to man. Only by knowing the working mechanisms of these ecosystems, can man hope to develop sound management practices for his post-harvest storage systems and exploit fully the resources they contain.

The ecosystem has four constituents: (A) *Non-living matter*, e.g. major inorganic and organic compounds of the environments; (B) *Producers* or *autotrophs*, e.g. chlorophyll-bearing plants and the algae which are capable of producing food from simple inorganic substances: (C) *Consumers*, heterotrophic organisms, usually animals and fungi feeding directly on live plants which ingest or absorb the saps of other organisms; and (D) *Decomposers*, heterotrophic organisms, mainly bacteria and fungi, that break down the complex compounds of dead protoplasm and absorb simple substances to be used by future producers. This unidirectional and non-cyclic flow of energy is the central principle of the ecosystem. Microflora have always been considered, usually by animal ecologists, as decomposers that do not consume live cells of the producers. But in a stored grain ecosystem, several fungi act as consumers by directly feeding on and killing the living cereal seed (producers). Most important among them is *Aspergillus candidus* which kills and discolors germs of seeds very rapidly causing considerable energy release (heating up to 55 °C) and death and disintegration of the kernel. Some other post-harvest fungi with similar consumer roles are *A. glaucus*, *A. flavus* and *Penicillum* spp. (Christensen, 1978). Like saprophytic bacteria and yeast, several species of *Aspergillus*, and *Penicillium* seem to act as decomposers. These microflora not only absorb sap for their own growth, but also by their exo-enzyme digestive action, release the essential elements bound in the protoplasm of dead seeds. The released basic elements are then mixed with the soil and become available for re-use by cereal crops and other green plants. It is important to note that some energy, expressed in calories, is released and dissipated in the environment at each level of the energy transfer; each level is called a trophic level. The body tissues, expressed as a dry weight at any trophic level, are called the biomass, which never fully accounts for the total energy dissipated as heat or converted as by-products (antibiotics, mycotoxins, etc.). Figure 8 shows a schema of the direction of the energy flow in a wheat —*Alternaria*, *Gonatobotrys* food chain in the preharvest wheat crop agro-ecosystem. At each energy transfer —there may be four or five transfers in some ecosystems — the lost energy occurs mainly through respiration (unshaded parts of the histograms). The biomass is shown in the shaded area. Figure 9 shows the pathways of energy flow in a post-harvest stored wheat ecosystem. *Aspergillus* and *Penicillium* are the primary consumers feeding on live wheat kernels. Mycophagous mites feeding on these fungi are secondary consumers at the third trophic level. When seeds are dead, bacteria, yeast, and some species of *Aspergillus* and *Penicillium*

feed and break down the dead seed tissues, releasing much energy through respiration and producing various by-products, such as oxalic acid, gluconic acid, and mycotoxins. CARTER and YOUNG (1950) demonstrated the relation between the respiratory activity of *Aspergillus* spp. (*Aspergillus candidus, A. flavus, A. glaucus* and *A. niger*) growing on sterilized, dead wheat of 20 p. 100 moisture and the calculated and observed temperature changes of similar wheat stored in vacuum flasks. *Aspergillus* respired rapidly and generated heat quickly. Its maximum oxygen consumption was 112.7 $mm^3/g$ /hour on the eleventh day, while the peak temperature increment of 15.2 °C was reached on the 15th day. Rapid increases in spore load and fat acidity were also noted. They calculated the heat liberated in respiration. It is based emperically on the combustion of sucrose, for every cubic cm of oxygen absorbed:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 12\ O_2 \rightarrow 12\ CO_2 + 11\ H_2O + 1{,}349.6\ k\ cal$$

But genotypic and reproductive considerations often influence heat production in storage fungi. CARTER and YOUNG (1950) noted that when most sterilized wheat was inoculated with *A. candidus, A. flavus* or *A. niger* the rates of respiration and heat production both increased at a high rate. However, *A. glaucus* sometimes showed different rates. These differences were associated with the type of spores produced. Sexual reproduction through the production of ascopores was associated with moderate oxygen uptake and very little heat production. Asexual reproduction through the production of conidia, however, caused considerably higher respiration and heat generation.

A schema of relationships at the individual or cellular level of microflora as its functional attributes are determined by the interplay of triple factors —nutrition, genotype and environment— is presented in figure 5. Although the ecology of microflora of stored grain must be studied —the higher levels of organization, such as population, community and the ecosystem— the key to the innate functional traits of these organisms still lies at the cellular and molecular level of the individual of a species. The mechanisms of their progression interactions should be taken into account at all higher levels of study.

## Conclusion

In conclusion, the ecology of microflora in stored grain can be best understood if the individual species or strains of microorganisms are studied simultaneously from the standpoints of population, community and ecosystem ecology. At present, we have considerable information only on populations and physical limits of microflora isolated under laboratory conditions radically different from those of a functioning stored grain ecosystem. A few serious microfloral community studies have also been done, but information on energy flow within stored grain ecosystems is virtually non-existant. A realistic and integrated knowledge of microflora is essential for proper management and long-term planning of post-harvest grain storage systems. Managers and scientists working in this area, would be most effective if they adopted an ecological systems approach as a basis for their operational decisions.

*Reçu pour publication en mai 1979.*

## Résumé

*Écologie de la microflore de stockage*

La microflore des grains stockés est envisagée sous les trois aspects principaux de l'écologie moderne : population, communauté, écosystème. L'étude examine les facteurs génétiques, nutritionnels basaux et les facteurs de l'environnement, dans leurs relations au niveau cellulaire sur la microflore. Des courbes exponentielles et des courbes en J rendent compte comparativement de la croissance des champignons chez les céréales fraîchement récoltées et chez les céréales stockées.

Les grains stockés à teneur en eau élevée présentent des microflores qui diffèrent dans les types de successions écologiques des communautés; la plus grande partie de la microflore du champ disparaît habituellement au cours du stockage. Les pyramides d'énergie qui rendent compte de la direction du flux d'énergie et des relations énergétiques d'une chaîne alimentaire théorique — Blé, *Alternia*, *Gonatobotrys* — apportent une interprétation de la dynamique fonctionnelle des écosystèmes artificiels que sont les grains stockés. Les caractéristiques des écosystèmes des grains stockés sont décrites selon la théorie de MARGALEF sur les écosystèmes.

Une connaissance intégrée de la microflore et des variables biotiques et abiotiques qui lui sont associées apparaît ainsi essentielle à la bonne gestion, à court et à long terme, des systemes écologiques que constituent les grains stockés.


## Références


AYERST G., 1969. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *J. stored Prod. Res.*, **1**, 127-41.

BRONSWIJK J. E. M. VAN, SINHA R. N., 1971. Interrelations among physical, biological and chemical variates in stored-grain ecosystems; a descriptive and multivariate study. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **64** (4), 789-803.

CARTER E. P., YOUNG G. Y., 1950. Role of fungi in the heating of moist wheat. *U.S.D.A. Circular No.* 383, 26 p.

CAHAGNIER B., POISSON J., 1973. La microflore des grains de maïs humide : composition et évolution en fonction de divers modes de stockage. *Rev. Mycol.*, **38**, 23-43.

CHRISTENSEN C. M., 1978. Storage fungi. Chapt. 7, pp. 173-190, In *Food and beverage mycology* (Ed. L. R. Beuchat), Avi Publising Co., Westport, Connecticut.

CHRISTENSEN C. M., KAUFMANN H. H., 1969. Grain storage — the role of fungi in quality loss. Univ. of Minnesota *Press*, Minneapolis, 153 p.

CLARK L. R., GEIER P. W., HUGHES R. D., MORRIS R. E., 1967. *The ecology of insect populations in theory and practice*. Methuen, London, 232 p.

CORRY J. E. L., 1978. Relationships of water activity of fungal growth. Chapt. 2, 45-82, In *Food and beverage mycology* (Ed. L. R. Beachat), Avi Publishing Co., Westport, Connecticut.

FLANNINGAN B., 1978. Primary contamination of barley and wheat grain by storage fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **71** (1), 37-42.

HYDE M. B., GALLEYMORE H. B., 1951. The subepidermal fungi of cereal grain. II. The nature, identity, and origin of the mycellium in wheat. *Ann. Appl. Biol.*, **38**, 348-356.

KORMONDY E. J., 1969. *Concepts of ecology*. Prentice-Hall, Engewood Cliffs, New Jersey, 209 p.

LACEY J., 1971. The microbiology of moist barley storage in unsealed silos. *Ann. Appl. Biol.*, **69**, 187-212.

LAGRANDEUR G., POISSON J., 1968. La microflore du maïs, son évolution en fonction des conditions hydriques et thermiques de stockage en atmosphère renouvelée. *Ind. Alim. Agric.*, **6-7**, 775-788.

LUTEY R. W., CHRISTENSEN C. M., 1963. Influence of moisture content, temperature and length of storage upon survival of fungi in barley kernels. *Phytopathology*, **53**, 713-717.

MARGALEF R., 1963. On certain unifying principles in ecology. *Amer. Naturalist*, **97**, 357-374.

MARTIN P. M. D., GILMAN G. A., 1976. A consideration of the mycotoxin hypothesis with special reference to the microflora of maize, sorghum, wheat and groundnuts. *Rep. Trop. Prod. Inst.*, G **105**,.112 p.

MOUBASHER A. H., ELNAGHY M. A., ABDEL-HAFEZ S. I., 1972. Studies on the fungus flora of three grains in Egypt. *Mycopath. Mycol. Appl.*, **47**, 261-274.

MULINGE S. K., CHESTERS C. G. C., 1970. Ecology of fungi associated with moist stored barley grain. *Ann. Appl. Biol.*, **65**, 277-284.

MULTON J.-L., TRENTESAUX E., GUILBOT A., 1973. Détermination de l'aptitude des grains à l'utilisation immédiate et au stockage. *Ann. Technol. Agric.*, **22** (3), 195-210.

ODUM E. P., 1962. Relationships between structure and function in ecosystems. *Jap. J. Ecol.*, **12**, 108-118.

ODUM E. P., 1971. *Fundamentals of ecology*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 574 p.

PANASENKO V. T., 1967. Ecology of microfungi. *Bot. Rev.*, **33**,.189-215.

PEARL R., 1926. The biology of population growth. A. A. Knopf, New York.

PELHATE J., 1974. Maladies des grains stockés (blé-orge). *C. R. 4e J. Phytiatrie Phytopharm. Montpellier*, 236-256.

PIXTON S. W., WARBURTON S., HILL S. T., 1975. Long-term storage of wheat. III. Some changes in the quality of wheat observed during 16 years of storage. *J. Stored Prod. Res.*, **11**, 177-185.

POISSON J., 1972. Évolution de la microflore du maïs-grain traité par l'acide propionique. *C. R. Acad. Agric. France*, **26** (1).

RICHARD-MOLARD D., CAHAGNIER B., POISSON J., DRAPRON R., 1976. Évolution comparées des constituants volatils et de la microflore de maïs stockés sous différentes conditions de température et d'humidité. *Ann. Technol. Agric.*, **25** (1), 29-44.

RIGHELATO R. C., 1975. Growth kinetics of mycelial fungi. Chapt. 5, 79-103, In *The filamentous fungi* (Ed. SMITH J. E., BERRY D. R.), Edward Arnold, London, 340 p.

SEMENIUK G., 1954. Microflora. Chapt. III, 77-151; In *Storage of cereal grains and their products* (Ed. ANDERSON J. A., ALCOCK A. W.), Amer. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, Minnesota, 515 p.

SINHA R. N., 1973. Ecology of storage. *Ann. Technol. Agric.*, **22** (3), 351-369.

SINHA R. N., WALLACE H. A. H., 1965. Ecology of a fungus-induced hot spot. *Can. J. Plant Sci.*, **45**, 48-59.

SINHA R. N., WALLACE H. A. H., CHEBIB F., 1969. Principal component analysis of interrelations among fungi, mites and insects in grain bulk ecosystems. *Ecology*, **50** (4), 536-547.

STAWICKI S., KAMINSKI E., NIEWIAROWICZ A., TROJAN M., WASOWICZ E., 1973. The effect of microflora on the formation of odors in grain during storage. *Ann. Technol. Agric.*, **22** (3), 309-336.

TANSLEY A. G., 1935. The use of abuse of vegetational concepts and terms. *Ecology*, **16**, 284-307.

WALLACE H. A. H., SINHA R. N., MILLS J. T., 1976. Fungi associated with small wheat bulks during prolonged storage in Manitoba. *Canadian J. Bot.*, **54** (12), 1332-1343.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, 28 (2) 211-222.

# Évolution des constituants protéiques et lipoprotéiques de l'albumen de blé en cours de maturation

Nicole CROZET et A. GUILBOT (*)

*Station Centrale de Physiologie animale,*
*Centre national de Recherches zootechniques, I.N.R.A.,*
*78350 Jouy-en-Josas*
(*) *Atelier d'Études et de réalisations technologiques, I.N.R.A.,*
*Centre de Recherches de Nantes,*
*Chemin de la Géraudière, 44072 Nantes*

## Résumé

Des examens en microscopie électronique à transmission et à balayage d'albumen de blé prélevé en cours de maturation ont permis de suivre le devenir des protéines de réserve et d'autres constituants cellulaires.

L'ensemble des résultats obtenus suggère qu'en fin de maturation, à la suite de pressions externes, les membranes des corpuscules protéiques — siège d'accumulation des protéines de réserve des grains — se rompent; les contenus de ces organites se mêlent alors en incluant dans la matrice protéique ainsi formées des structures cytoplasmiques, notamment de nature lipoprotéique.

Les fragments adhérant aux grains d'amidon apparaissent constitués par des résidus cellulaires (protéines solubles dans les solutions salines, lipoprotéines) alors que la matrice est en grande partie formée par des protéines éthanolosolubles.

Les examens au microscope électronique à balayage de matériel fixé par le tétraoxyde d'osmium semblent indiquer l'existence de dépôts lipidiques dans les cellules de l'albumen.

Mots clés : *protéines, lipoprotéines, albumen, blé, maturation, microscopie électronique.*

## Introduction

L'évolution, en cours de maturation, des cellules de l'albumen de blé et de leurs principaux constituants, a déjà fait l'objet d'un certain nombre d'études. En ce qui concerne les protéines de réserve, GRAHAM *et coll.* (1962); JENNINGS, MORTON et PALK (1963) et BUTTROSE (1963) situent le début de leur synthèse

7 jours environ après l'anthèse; ces protéines sont accumulées dans des corpuscules arrondis de quelques µm de diamètre. En général, l'évolution de ces corpuscules protéiques n'a pas été observée au-delà du vingt-cinquième jour après l'anthèse en raison des difficultés rencontrées dans l'obtention de coupes ultrafines à partir de caryopses proches de la maturité. Ceci pose un problème, puisque l'examen de produits de mouture, semoules ou farines (HESS, 1954; CROZET *et coll.*, 1966; SECKINGER et WOLF, 1967; SIMMONDS, 1972) montre que, contrairement à d'autres céréales telles que le maïs, il n'existe pas de corpuscules protéiques dans l'albumen de blé mûr; les protéines de réserve s'y trouvent sous forme de fragments (protéines interstitielles) occupant à peu près tout l'espace libre entre les grains d'amidon. Dans ce travail, nous avons essayé, grâce à des examens complémentaires en microscopie électronique à transmission et à balayage, de préciser comment les constituants cellulaires de l'albumen immature se transforment pour donner les structures protéiques et lipoprotéiques présentes dans les farines.

## Matériel et méthodes

Le blé de printemps utilisé, issu d'un croisement, « Frontana » × « Étoile de Choisy », lignée « I.N.R.A. (FEC 28) », a été cultivé en pépinière à la Station d'Amélioration des Plantes de l'I.N.R.A. à Versailles.

Les prélèvements espacés de 3 à 10 jours ont été effectués entre le septième jour après l'anthèse et la fin de la maturation. Seuls les grains de la région médiane des épis ont servi pour l'expérimentation.

### 1. — *Préparation des échantillons en vue de leur examen au microscope électronique à transmission (MET)*

Aussitôt après la récolte, des fragments d'albumen sont fixés au glutaraldéhyde à 6 p. 100 dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,2, pendant 20 h à 4 °C. Après rinçage, ils sont inclus dans l'épon selon la technique de LUFT (1961). Pour améliorer, dans certains cas, la pénétration du milieu d'inclusion, les bains d'épon sont prolongés pendant plusieurs jours ou plusieurs semaines, à 4 °C, avec renouvellement des bains, selon la méthode préconisée par SIMMONDS (1972). Les coupes fines sont colorées par flottation pendant 2 heures, à température ambiante, sur une solution saturée d'acétate d'uranyle dans l'eau distillée. Elles sont ensuite examinées avec un microscope SIEMENS de type Elmiskop I.

### 2. — *Préparation des échantillons en vue de leur examen au microscope électronique à balayage (MEB)*

Les grains très hydratés correspondant à des stades peu avancés du développement sont immédiatement lyophylisés après récolte. Dans certains cas, ils sont fixés 30 min, à température ambiante, par une solution de tétraoxyde d'Osmium à 1 p. 100 dans un tampon acétate-véronal de pH 7,4. Tous les grains coupés transversalement avec une lame de rasoir sont recouverts, par évaporation sous vide,

d'un film métallique de carbone et d'or de 150 à 200 Å d'épaisseur; ils sont ensuite observés avec un microscope JEOL JSM 50 A, à des tensions d'accélération de 12 à 15 kV.

### 3. — *Hydrolyses enzymatiques et extraction par l'éthanol*

Elles sont effectuées sur coupes épaisses (plusieurs µm) de caryopses prélevés 30 jours après l'anthèse).

Les enzymes utilisées sont une amylase bactérienne purifiée, de préparation industrielle (Rapidase) choisie pour sa faible activité protéolytique (55 unités P contre 2 240 000 unités A selon les normes ICC), une protéase fongique (Rapidase) de faible activité amylolytique (14 unités A contre 1 300 000 unités P).

*Conditions expérimentales*

Après divers essais, nous avons retenu une concentration de 10 mg d'enzyme pour 100 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 7 et un temps d'hydrolyse de 20 h à 37 °C. Les coupes après flottation sur le milieu d'incubation sont soigneusement rincées dans le tampon puis l'eau distillée.

Le traitement par l'éthanol à 70 p. 100 est effectué pendant 48 h à 4 °C.

## Résultats

Les résultats rapportés ici sont relatifs à l'évolution des constituants cellulaires de l'albumen profond des zones dorsales ou latérales des grains.

Dès le septième jour après l'anthèse, des corpuscules protéiques de faibles dimensions — 0,8 à 2 µm — sont visibles (fig. 1*a*). Leur contenu est homogène et moyennement contrasté, bien que certains d'entre eux présentent à leur périphérie des inclusions globulaires plus opaques aux électrons (fig. 1*b*); ils sont délimités par une membrane n'adhérant pas toujours parfaitement à leur surface. Quelques corpuscules sont isolés dans le cytoplasme mais la plupart se trouvent à proximité du reticulum endoplasmique. Très rapidement, les corpuscules protéiques augmentent de volume. Ainsi, 10 jours après l'anthèse (fig. 1*c*), les plus gros atteignent des dimensions de l'ordre de 5 µm qui doublent pendant les 4 ou 5 jours suivants. Des vésicules et des ribosomes sont associés à la membrane qui les entoure.

L'examen en MEB révèle, aussi bien au septième qu'au dixième jour après l'anthèse, un contenu cellulaire peu compact (fig. 2*a*), où seuls les grains d'amidon de forme lenticulaire sont nettement différenciables. Les replis de la membrane plastidiale observés à la surface de ceux-ci sont probablement dûs aux effets de séchage intervenant durant la préparation du matériel. On peut remarquer le sillon équatorial des grains et parfois leur « noyau » en relief. Lorsque le grain de blé est préalablement fixé par le tétraoxyde d'osmium, on constate des modifications structurales se traduisant par l'apparition de fins filaments et de globules de 0,5 à quelques µm (fig. 2*b*).

A partir de la troisième semaine après l'anthèse, les cellules contiennent des quantités de plus en plus importantes de substances de réserve; en particulier le

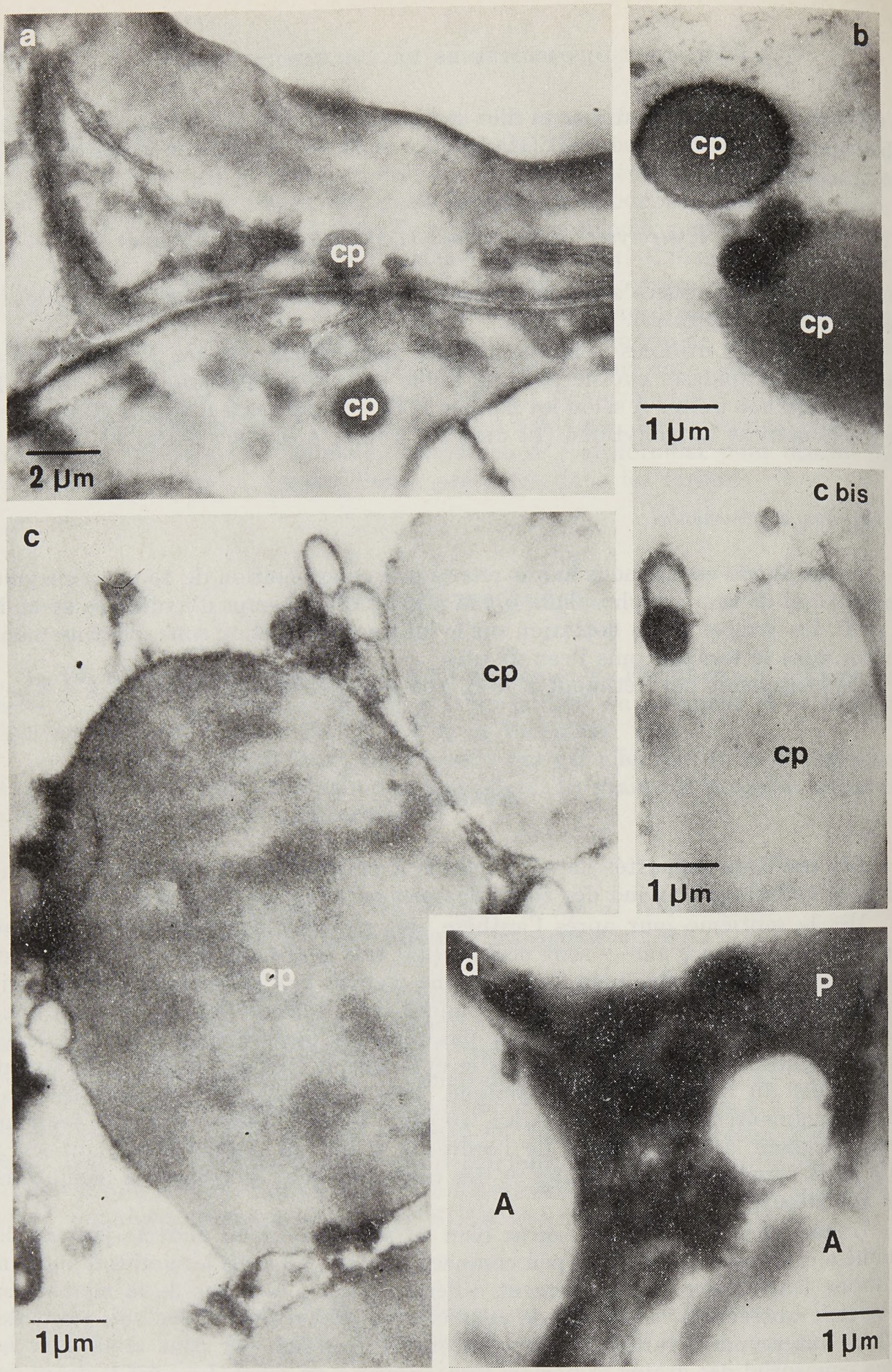



FIG. 1. — *Albumen de blé* (« *Frontana* » × « *Étoile de Choisy* ») *en cours de maturation. Examens MET. Fixation glutaraldéhyde, coloration acétate d'uranyle.*

*a* : Cellules d'albumen (7 jours); de petits corpuscules protéiques (cp) sont présents dans le cytoplasme.

*b-c* et *c* bis : Corpuscules protéiques (10 à 14 jours) entourés d'une membrane avec vésicules et inclusions contrastées à la périphérie.

*d* : 38 jours après l'anthèse, entre les grains d'amidon (A), la matrice protéique (P) renferme des inclusions, résidus d'organites cellulaires.

volume occupé par les grains d'amidon s'accroît rapidement, ce qui tend à limiter l'espace cellulaire disponible pour les autres constituants. Les corpuscules protéiques, encore visibles en MET aux environs du vingtième jour, disparaissent en fin de maturation. On remarque alors que les protéines de réserve forment entre les grains d'amidon une matrice incluant diverses structures cytoplasmiques, résidus de reticulum, de membranes plastidiales et globules contrastés (fig. 1*d*). La formation de cette matrice apparaît clairement à l'examen en MEB. Ainsi, décelable dès le quatorzième jour après l'anthèse, elle reste peu abondante durant les troisième et quatrième semaines (fig. 2*c*). On note à ce stade l'apparition d'un grand nombre de corpuscules arrondis de quelques µm de diamètre. Après fixation osmique, on remarque, comme dans les stades plus jeunes, de petits globules à la surface des grains d'amidon et des fragments protéiques.

Au cours des dernières semaines, la matrice se développe et tend à occuper tout l'espace entre les grains d'amidon, ce qui donne à l'ensemble un aspect compact (fig. 2*d*); là où de petits grains d'amidon ont été arrachés, on peut voir leurs emplacements sous forme de loges dans la masse protéique.

Afin d'apporter quelques précisions sur la nature de la matrice et des corpuscules de quelques µm qui sont présents en grand nombre à partir du dix-septième jour, nous avons essayé d'éliminer l'amidon par amylolyse et certaines fractions protéiques par protéolyse ou par extraction à l'éthanol à 70 p. 100. Ces expériences ont été conduites sur des grains de blé prélevés 30 jours après l'anthèse.

*Élimination des protéines*

Après hydrolyse par une protéase fongique, de nombreux corpuscules de quelques µm de diamètre subsistent (fig. 3*a*), ce qui semble indiquer leur nature amylacée. Ces petits grains d'amidon possèdent toutefois une forme polyédrique inhabituelle. Si des corpuscules protéiques ont disparu au cours de cette hydrolyse, cela est difficile à évaluer. Par contre, la matrice qui entourait les grains d'amidon a complètement disparu; ces derniers restent accolés les uns aux autres, mais ne sont plus reliés entre eux. En outre, leur surface, débarrassée des protéines adhérentes, apparaît lisse, exception faite cependant des replis de la membrane plastidiale et de certaines empreintes laissées par des corpuscules protéiques ou de petits grains d'amidon.

Après traitement par l'éthanol à 70 p. 100, de nombreux corpuscules sont également présents; leur forme dans ce cas n'apparaît pas modifiée. La matrice, elle, n'est pas extraite en totalité, bien qu'elle soit moins abondante que dans les échantillons non traités (fig. 3*b*). On remarque, en outre, à la surface des grains d'amidon, la présence de petits fragments plus ou moins filamenteux et des globules de 0,5 à 1 µm.

*Élimination de l'amidon*

La digestion complète de l'amidon provoque la disparition du contenu d'un grand nombre de cellules. Sur de tels échantillons, on voit des parois cellulaires délimitant des espaces à l'intérieur desquels subsistent quelques corpuscules (fig. 3*c*). Il est probable que l'extraction de l'amidon, qui occupe un volume très important, dans les cellules, entraîne aussi celle d'autres constituants. Parmi les corpuscules présents après amylolyse, seuls les plus gros (5 µm) semblent attaqués

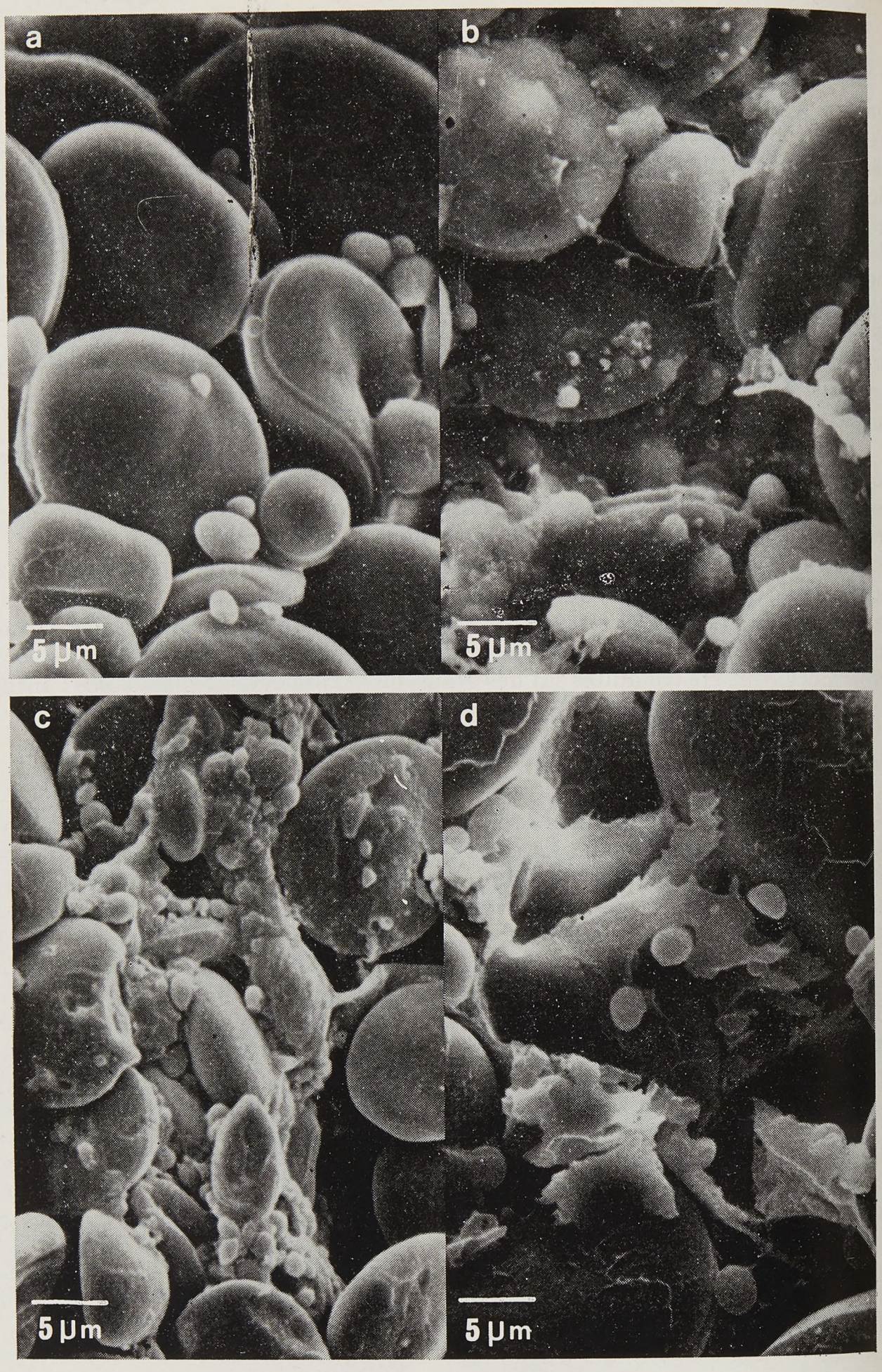



FIG. 2. — *Albumen de blé* (« *Frontana* » × « *Étoile de Choisy* ») *en cours de maturation. Examens en MEB.*

*a* : Albumen (7 jours) lyophilisé présentant un contenu cellulaire peu dense.
*b* : Albumen (7 jours) fixé par $O_sO_4$ en solution aqueuse et lyophilisé; de nombreux filaments et globules (0,5 à quelques µm) sont observables.
*c* : Albumen (28 jours) fixé par $O_sO_4$ en solution aqueuse; le réseau protéique est plus dense; de petits globules sont également présents.
*d* : Albumen (49 jours); la matrice protéique occupe tout l'espace libre entre les grains d'amidon.

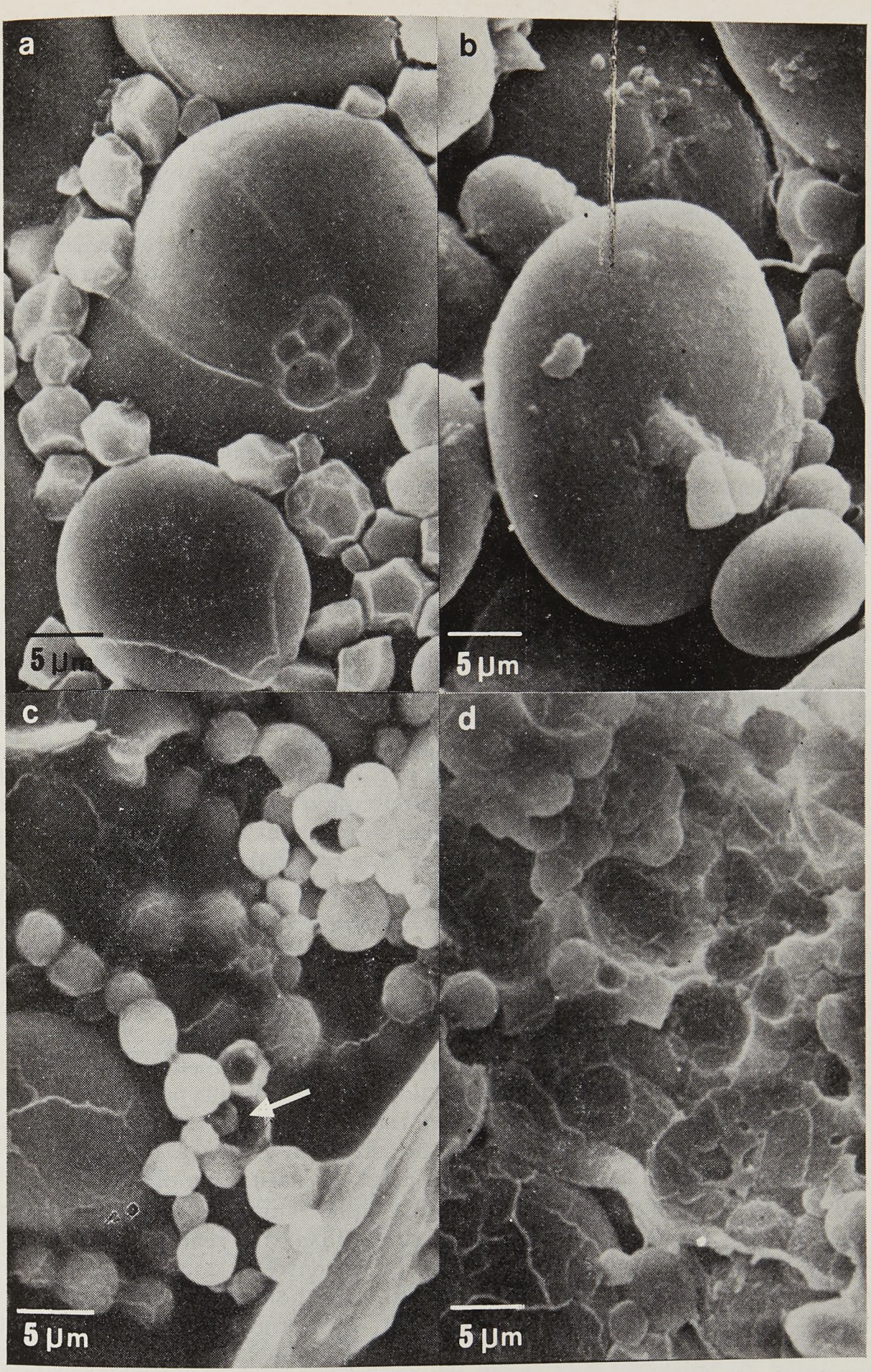



FIG. 3. — *Albumen de blé (« Frontana » × « Étoile de Choisy ») 30 jours après anthèse. Examens en MEB après élimination des protéiques ou de l'amidon.*

*a* : Digestion par une protéase : seuls les grains d'amidon subsistent, les plus petits ont subi un début de corrosion.

*b* : Extraction par l'éthanol à 70 p. 100; la matrice protéique est en partie éliminée, des fragments restent adhérents aux grains d'amidon.

*c* et *d* : Digestion par une amylase : de petits corpuscules subsistent, certains étant attaqués par l'enzyme (flèches); lorsque l'ensemble du contenu cellulaire n'est pas éliminé en même temps que l'amidon, on observe la matrice protéique dense et compacte.

par l'enzyme; les autres sont vraisemblablement des corpuscules protéiques. Dans certaines cellules, dont le contenu est mieux préservé, la matrice lipoprotéique est bien apparente (fig. 3*d*). Elle constitue une masse relativement dense, à l'intérieur de laquelle on peut distinguer les traces laissées par les grains d'amidon digérés.

## Discussion

Nous avons observé que les corpuscules protéiques, apparus à la fin de la première semaine après l'anthèse, augmentent ensuite très rapidement de volume jusqu'aux environs de la quatrième semaine. Ce développement semble concorder avec une croissance linéaire de la teneur globale en N protéique du grain telle qu'elle a été déterminée par divers auteurs, notamment par FEILLET (1965). L'accroissement de la teneur en protéines du grain se stabilise ensuite, atteignant un palier, 35 jours environ après l'anthèse.

La description des corpuscules protéiques que nous avons donnée est dans l'ensemble en accord avec celles rapportées par d'autres chercheurs. Nous observons un contenu homogène des corpuscules (MORTON, PALK et RAISON, 1964), non granuleux comme le signale BUTTROSE (1963). Ceci tient probablement à la nature du fixateur ($KMnO_4$) utilisé par ce dernier. Les ribosomes associés à la membrane entourant ces corpuscules que nous décelons après coloration par l'acétate d'uranyle ont également été décrits par MORTON, PALK et RAISON (1964). Par contre, si nous observons souvent du reticulum endoplasmique, à proximité des corpuscules protéiques, il n'apparaît pas directement associé à leur membrane comme le signalent JENNINGS, MORTON et PALK (1963).

La nature des inclusions contrastées observées par divers auteurs et par nous-mêmes, à la périphérie des corpuscules protéiques, n'est pas à l'heure actuelle clairement établie. Ainsi, d'après MORTON, PALK et RAISON (1964), ces inclusions seraient riches en acide phytique. Par contre, TANAKA, YOSHIDA et KASAI (1974), à la suite d'une étude par microautoradiographie, affirment que les dépôts d'acide phytique se produisent dans les cellules de la couche à aleurone et non dans les corpuscules protéiques de l'albumen profond. Il existe par ailleurs, dans l'albumen mature et dans les farines, des globules osmiophiles du même type, de nature essentiellement lipidique (SECKINGER et WOLF, 1967; CROZET et GUILBOT, 1974). Ceci nous suggère donc que les inclusions contrastées observées à la périphérie des corpuscules protéiques puissent être également de nature lipidique.

A partir du vingt-vingt-cinquième jour après l'anthèse, les coupes minces favorables à un examen en transmission sont difficiles à réaliser. Rappelons en effet que la quantité d'amidon croît linéairement entre le douzième et le trente-cinquième jour, atteignant 60 p. 100 environ du poids total de l'albumen au terme de la maturation (GUILBOT, 1963). Or, les grains d'amidon non pénétrés par le milieu d'inclusion tendent à s'arracher et à gonfler au moment de la coupe, provoquant des distorsions au niveau des autres constituants cellulaires. Néanmoins, malgré la qualité imparfaite des coupes obtenues, les examens en MET nous ont cependant permis une approche du phénomène d'évolution des corpuscules protéiques dans les derniers stades de la maturation du grain; des renseignements complémentaires nous étant par ailleurs fournis par les examens en MEB.

L'ensemble de ces résultats nous conduit à proposer un schéma d'évolution

des corpuscules protéiques (fig. 4). Par suite de fortes pressions externes, les membranes des corpuscules protéiques tendraient à se rompre; les contenus protéiques de ces organites se mêleraient alors, englobant dans la masse ainsi formée diverses structures cytoplasmiques, en particulier de nature lipoprotéique (résidus membranaires, reticulum). On constate également que les inclusions contrastées contenues dans les corpuscules protéiques sont présentes dans cette matrice. BUTTROSE (1963) a émis l'hypothèse que les protéines interstitielles de la farine ont pour origine les corpuscules protéiques, alors que les protéines adhérentes seraient constituées par des résidus de plastes et de protéines cytoplasmiques condensées au cours de la phase de déshydratation. Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse; mais le schéma que nous proposons permet tout à la fois de la compléter et de la nuancer. En effet, il apparaît que des résidus d'organites cellulaires sont présents

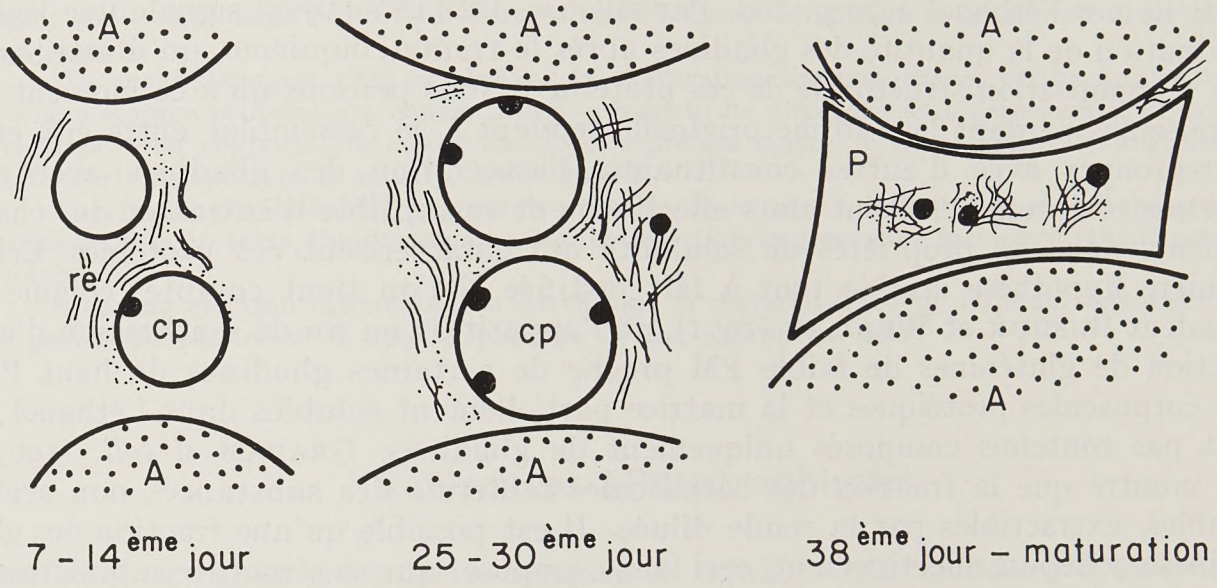



FIG. 4. — *Schéma d'évolution des corpuscules protéiques de l'albumen en cours de maturation.*

cp : Corpuscule protéique.
A : Amidon.
P : Matrice protéique.

non seulement à la surface des grains d'amidon, mais aussi à l'intérieur des fragments protéiques.

Les examens effectués au trentième jour en MEB après protéolyse permettent en outre d'apporter quelques précisions quant à la nature de ces protéines interstitielles ou adhérentes telles qu'elles ont été définies par HESS (1954). Ainsi, les fragments adhérant aux grains d'amidon apparaissent pour une bonne part de nature protéique, puisque digestibles par la protéase, mais ne semblent pas renfermer de protéines alcoolo-extractibles. Ceci laisse supposer, comme le suggère BUTTROSE (1963) qu'ils sont constitués par des résidus cellulaires de nature lipoprotéique, ce qui rejoint l'hypothèse de HESS. Cependant, ils pourraient également contenir des protéines cytoplasmiques; en effet, selon ELTON et EWART (1964) et COULSON et SIM (1965), les protéines adhérentes seraient plus riches en protéines solubles que les protéines interstitielles. C'est également ce que tendent à montrer les résultats obtenus par BARLOW, SIMMONDS et HENRICK (1973) grâce à des examens en microscopie à fluorescence. La matrice protéique, hydrolysée par la protéase, est au contraire partiellement soluble dans l'éthanol à 70 p. 100. Il ne nous

a pas été possible de mettre en évidence de façon claire une digestion des corpuscules protéiques par la protéase, ni une extraction de ceux-ci par l'éthanol à 70 p. 100 comme ont pu le faire, sur coupes, CHRISTIANSON *et coll.* (1969) et plus récemment WOLF et KHOO (1975) dans le cas du maïs. Nous étions pour cela gênés par la présence de nombreux petits grains d'amidon. Ces derniers semblent d'ailleurs subir un début de corrosion au cours de la protéolyse, résultant probablement de l'action d'amylases présentes en très faibles quantités dans la préparation protéasique utilisée.

L'analyse biochimique de la fraction des corpuscules protéiques (GRAHAM *et coll.*, 1963*a* et *b*) tend à montrer qu'ils contiennent des protéines de type gliadine. Il semble même que l'on puisse établir une corrélation entre le développement de ces corpuscules et l'augmentation globale du taux des gliadines dans le grain. Dans la mesure où selon notre hypothèse, la matrice est en grande partie constituée par des corpuscules protéiques agglomérés, cela peut expliquer son extraction partielle par l'éthanol à 70 p. 100. Par ailleurs, FEILLET (1965) signale une légère diminution de la quantité des gliadines après le trente-cinquième, qu'il attribue à une réorganisation structurale de ces protéines. Nous pensons qu'à ce moment les corpuscules perdant leur forme originelle tendent à se rassembler entre eux et à se regrouper avec d'autres constituants; l'association des gliadines avec des substances étrangères étant alors effectivement susceptible d'entraîner des changements dans les propriétés de solubilité qui caractérisent ces protéines. Cette dernière hypothèse semble tout à fait justifiée si l'on tient compte, comme le signalent BUSHUK et WRIGLEY (1971), de l'apparition en fin de maturation d'une fraction de gluténines de faible PM proche de certaines gliadines de haut PM. Les corpuscules protéiques et la matrice partiellement solubles dans l'éthanol ne sont pas toutefois composés uniquement de gliadines. GRAHAM *et coll.* (1963*b*) ont montré que la fraction des corpuscules renferme des substances non acido-solubles, extractibles par la soude diluée. Il est possible qu'une fraction des gluténines s'y dépose effectivement; ceci laisse supposer que sa structure submicroscopique est identique à celle des protéines alcoolo-solubles, puisque les contenus corpusculaires apparaissent homogènes (LEFEBVRE *et coll.*, 1977). Dans le cas du maïs, une étude récente en MET (WOLF et KHOO, 1975) montre d'ailleurs que les corpuscules protéiques renferment à la fois des protéines alcoolo-solubles (zéine) et des résidus protéiques insolubles dans l'éthanol.

Une autre fraction des gluténines proviendrait de résidus protéiques et lipoprotéiques d'organites cellulaires, tels que des membranes, du reticulum endoplasmique, etc. La proportion relativement élevée de ces structures par rapport aux protéines de réserve pendant les premiers stades de développement du grain devient ensuite plus faible, lorsque le volume des corpuscules protéiques augmente.

La présence de dépôts lipidiques, décrits dans un certain nombre de cellules végétales et en particulier dans les tissus de réserve, n'a jamais été mentionnée dans l'albumen de blé. C'est pourquoi, il paraît important de souligner que dès les premiers stades de la maturation, on observe — en MEB après traitement par $O_sO_4$ — de petits globules à la surface des grains d'amidon et des fragments protéiques. Il a par ailleurs été montré (CROZET et GUILBOT, 1974) que $O_sO_4$ en solution aqueuse tend à provoquer un rassemblement des lipides libres de la farine sous forme de globules semblables à ceux-ci. En général, la présence de globules lipidiques dans la farine est attribuée à un apport extérieur provenant de la couche à aleurone et surtout du germe. Les observations rapportées ici semblent indiquer que des dépôts lipidiques se produisent également dans l'albumen de blé.

*Reçu pour publication en mai 1979.*

## Remerciements

Nous tenons à remercier Mme CAUDERON, Directeur de Recherches à la Station d'amélioration des Plantes de l'I.N.R.A. à Versailles, qui a aimablement mis à notre disposition ce matériel d'étude.

## Summary

*Evolution of protein and lipoprotein components during the maturation of wheat endosperm*

Transmission and scanning electron microscopic observations during the maturation of wheat endosperm allowed to demonstrate modifications of storage proteins and other cellular components.

The results suggest that at the end of maturation the membranes of the protein bodies —where storage proteins are concentrated— tend to be disrupted as a consequence of external pressures; their contents are mixed and form a protein matrix in which cytoplasmic structures, particularly lipoprotein in nature, are included.

The fragments adhering to starch granules seem to be constituted of cellular residues (saline-soluble proteins, lipoproteins) while the matrix is in great part formed of ethanolo-soluble proteins.

Scanning electron microscopic observations of material fixed by Osmium tetroxyde seem to prove the existence of lipid deposition in the endosperm cells.

## Références bibliographiques

BARLOW K. K., SIMMONDS D. H. et HENRICK K. G., 1973. The localization of water-soluble proteins in the wheat endosperm as revealed by fluorescent antibody technic. *Experientia*, **29**, 229-231.

BUSHUK W. et WRIGLEY C. W., 1971. Glutenin in developing wheat grain. *Cereal Chem.*, **48**, 448-455.

BUTTROSE M. S., 1963. Ultrastructure of the developing wheat endosperm. *Aust. J. Biol. Sci.*, **16**, 305-317.

CHRISTIANSON D. D., NIELSEN H. C., KHOO U., WOLF M. J. et WALL J. S., 1969. Isolation and chemical composition of protein bodies and matrix protein in corn endosperm. *Cereal Chem.*, **46**, 372-381.

COULSON C. B. et SIM A. R., 1965. Wheat proteins. II. Changes in the protein composition of Triticum vulgare during the life cycle of the plant. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 499-508.

CROZET N., GALLANT D., GODON B., GUILBOT A. et PETIT L., 1966. Structure submicroscopique des fragments protéiques de farine de blé et du gluten séparé par lixiviation. *Industries Agricoles et Alimentaires*, **5**, 559-563.

CROZET N. et GUILBOT A., 1974. A note on the influence of osmium fixation on wheat flour lipids. Observation by transmission and scanning electron microscopy. *Cereal Chem.*, **51**, 300-304.

ELTON G. A. H. et EWART J. A. D., 1964. Electrophoretic comparison of cereal proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 119-126.

FEILLET P., 1965. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques. Thèse de Docteur-Ingénieur, Université de Paris. *Ann. Technol. Agric.*, **14** (hors série).

GRAHAM J. S. D., JENNINGS A. C., MORTON R. K., PALK B. A. et RAISON J. K., 1962. Protein bodies and protein synthesis in developing wheat endosperm. *Nature*, **196**, 967-969.

GRAHAM J. S. D., MORTON R. K. et RAISON J. K., 1963*a*. Isolation and characterization of protein bodies from developing wheat endosperm. *Aust. J. Biol. Sci.*, **16**, 375-383

GRAHAM J. S. D., MORTON R. K. et SIMMONDS D. H., 1963*b*. Studies of proteins of developing wheat endosperm. Fractionation by ion exchange chromatography. *Aust. J. Biol. Sci.*, **16**, 350-356.

GUILBOT A., 1963. État de nos connaissances sur les glucides de la farine, spécialement sur l'amidon. Cycle de Conférences « Farines » du C.T.U., *Bulletin du C.T.U.*, 43-63.

HESS K., 1954. Protein, Kleber und Lipoid in Weinzenkorn und Mehl. *Kolloid Zeitschrift.*, **136**, 84-89.

JENNINGS A. C., MORTON R. K. et PALK B. A., 1963. Cytological studies of protein bodies of developing endosperm. *Aust. J. Biol. Sci.*, **16**, 366-374

LEFEBVRE J., CROZET N., GUEGUEN J., SOUVANNAVONG W. et PETIT L., 1977. Caractérisation biochimique et submicroscopique des protéines du gluten de blé. *Ann. Techn. Agric.* (à paraître).

LUFT J. H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409-414.

MORTON R. K., PALK B. A. et RAISON J. K., 1964. Intracellular components associated with protein synthesis in developing wheat endosperm. *Biochem. J.*, **91**, 522-528.

SECKINGER H. L. et WOLF M. J., 1967. Lipid distribution in the protein matrix of wheat endosperm as observed by electron microscopy. *Cer. Chem.*, **44**, 669-674.

SIMMONDS D. H., 1972. The ultrastructure of the mature wheat endosperm. *Cereal Chem.*, **49**, 212-222.

TANAKA K., YOSHIDA T. et KASAI Z., 1974. Radioautoagraphic demonstration of the accumulation site of phytic acid in rice and wheat grains. *Plant Cell. Physiol.*, **15**, 147-151.

WOLF M. J. et KHOO U., 1975. Subcellular, distribution and enzyme digestibility of endosperm proteins of amylomaize and normal corn. *Cereal Chem.*, **52**, 771-778.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, 28 (2), 223-242.

# Essai de conservation des sojas humides sous atmosphères contrôlées : incidence de la microflore

J. PELHATE et R. THÉRIAULT

*Laboratoire d'Agrobiologie,*
*Faculté des Sciences et Techniques, 29283 Brest Cedex*
*Centre National d'Études et d'Expérimentation de Machinisme Agricole,*
*03150 Varennes-sur-Allier*

## Résumé

Les comportements de graines de soja humides, conservées en diverses atmosphères contrôlées (air confiné, vide partiel, azote et gaz carbonique) et à trois températures (5°, 20° et 30 °C), sont suivis pendant 6 mois par comparaison avec des lots témoins.

L'évolution de la microflore séminicole est corrélative de la qualité des graines, appréciée sous l'angle biologique (pouvoir germinatif) ou technologique (indice d'acidité de l'huile extractible, protéines solubles).

En dépit des conditionnements très diversifiés de l'essai, la forte humidité accroît le métabolisme des graines et permet le développement de la flore épiphyte; par suite, les atmosphères se chargent de gaz carbonique.

Il en résulte un déterminisme écologique dominé par l'anaérobiose; dans ces conditions, le cortège floristique se résout en quelques espèces micro-aérophiles (*Penicillium* spp. et mucorales) dont l'activité ou la survie dépendent principalement de la température.

La transposition pratique des résultats à la conservation des grains humides supposerait donc des aménagements : réduction de la teneur en eau et abaissement de la température, limitation de la durée de stockage en fonction de ces deux paramètres.

Mots clés : *soja, Glycine max, grains humides, anaérobiose, atmosphère contrôlée conservation, microflore, oléagineux.*

## Introduction

Les sojas récoltés en France comportent généralement une teneur élevée en eau. Deux voies s'imposent alors pour la conservation des graines : séchage préalable ou stockage en l'état et sous atmosphères contrôlées. La première solu-

tion, d'autant plus onéreuse que les substrats oléagineux appellent une exsiccation poussée (HUNT et PIXTON, 1974), reste encore aléatoire lorsque les grains ne sont pas à l'abri d'une reprise d'eau (CHRISTENSEN et DORWORTH, 1969). La seconde a été préconisée pour les grains humides, soit essentiellement les céréales (PETERSON *et al.*, 1956; HYDE, 1962, 1974) tandis que les tentatives portant sur oléagineux restent rares (MASSON, 1963, 1966; MOSELY *et al.*, 1971); il est d'ailleurs reconnu que les denrées stockées en atmosphère confinée perdent leurs qualités organoleptiques (POISSON, 1960) et sont le siège d'altérations biochimiques; lesquelles se manifestent notamment par émission de constituants volatils (RICHARD-MOLARD *et al.*, 1976) et limitent la valeur technologique et alimentaire.

Il importait donc de rechercher une amélioration éventuelle de ce procédé en accélérant les processus d'inhibition vis-à-vis des agents microbiologiques par diminution de la teneur en oxygène disponible ou substitution de gaz réputés inertes.

## Matériel et techniques

### *Matériel végétal*

Le lot de graines (var. AMSOY) récoltées très humides (teneur moyenne en eau de 30,5 p. 100 rapportée au poids humide) a été réparti sous divers conditionnements, deux jours après moissonnage-battage suivi de triage.

Pendant cette brève attente, l'étalement à l'air libre a prévenu tout échauffement sans interdire le développement des micro-organismes séminicoles, de sorte que le témoin apparaît, à l'analyse, très homogène et pourvu d'une microflore diversifiée. Voir Résultats.

### *Protocole expérimental*

Les graines sont réparties en bocaux d'un litre recevant environ 700 g et munis d'une fermeture hermétique (bouchon de caoutchouc maintenu par ligature). Un dispositif à tubulure, en relation avec un manomètre à mercure, permet le prélèvement, à pression constante, des gaz intergranulaires soumis à analyse.

Les atmosphères initiales réalisées dans les flacons sont les suivantes : air confiné, vide partiel, azote et gaz carbonique; des variantes intermédiaires, par mélanges de ces constituants pris deux à deux ne seront pas considérées ici. Précisons que le vide partiel initial (30 mm Hg en pression absolue) est maintenu, par pompages consécutifs et intermittents, entre 260 et 480 mm Hg et que l'admission de l'azote ou du gaz carbonique s'effectue après dépression (720 mm Hg), l'opération étant effectuée 3 fois au départ de l'essai; cette manipulation est inspirée d'une technique antérieurement préconisée (WALSH, 1969).

Des échantillons considérés comme témoins sont provisoirement maintenus à l'état semi-confiné, en bocaux ouverts.

Trois températures diversifient les conditions de l'essai : 5, 20 et 30 °C.

Les comportements différentiels des échantillons sont suivis pendant 24 semaines; la périodicité des prélèvements, pour contrôles divers, varie selon les

conditions de stockage et notamment la température qui, nous le verrons, détermine grandement le dynamisme de la microflore et l'évolution résultante du substrat. Voir la transcription graphique des résultats.

*Contrôles divers*

1. *Paramètres de l'environnement*

a) *Teneur en eau des graines.*

L'extraction d'eau est opérée en étuve Chopin à 105 ± 1 °C pendant 16 heures. L'opération (3 répétitions) porte sur des échantillons d'environ 10 g.

b) *Composition des gaz intergranulaires*

Les analyses des gaz ($CO_2$, $O_2$ et $N_2$) prélevés dans les bocaux ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse. L'appareil (marque GIRDEL, modèle 30 MCV) est équipé en phases stationnaires comme suit : tamis moléculaire 5A et Porapak Q.

c) *Température de stockage*

Les 3 conditions sont respectivement obtenues en réfrigérateur (5 ± 1 °C), en chambre conditionnée (20 ± 0,5 °C) et en étuve ventilée (30 ± 1 °C).

2. *Microflore séminicole*

Le recensement des bactéries et champignons peut comporter deux techniques :

— détection qualitative sur grains (thalles de champignons filamenteux essentiellement).

— numération de « germes » superficiels (bactéries, levures et spores de moisissures).

Les techniques d'isolement sur grains ont été antérieurement définies comme variantes de la « méthode d'Ulster » et adoptées en circonstances comparables (PELHATE, 1968*a*, 1970, 1978).

La localisation respectivement interne ou externe de la microflore suppose, avant ensemencement sur milieu nutritif, la désinfection superficielle ou non des graines; l'opération consiste en leur immersion (5 mn) dans une solution d'hypochlorite de sodium, suivie de 3 rinçages à l'eau stérile puis d'un « ressuyage » à l'alcool ou sur silicogel, en enceinte stérile; la concentration de la solution traitante a été réduite à 0,5 p. 100 de chlore actif, compte tenu de la perméabilité des téguments, rapidement accrue dans les conditions de l'essai (cf. atténuation du pouvoir germinatif et mort des semences).

Tous ces isolements sur grains individualisés supposent, dans chaque condition technique (graines telles quelles ou désinfectées, 3 (ou 4) milieux nutritifs, 1 (ou 2) température(s) d'incubation), l'ensemencement de 100 graines réparties en 10 boîtes de Pétri.

Les présences d'espèces (moisissures) sont alors notées et comptabilisées en condition optimale d'isolement; la contamination, par chaque espèce, est exprimée en pourcentage de grains; les résultats sont éventuellement cumulés par regroupement d'espèces affines.

La méthode des numérations, préconisée pour les contrôles bactériens, est transposable aux champignons sporulés selon les modalités suivantes : la suspension-mère est réalisée par l'agitation énergique (1 mn sur appareil Dangoumau) des grains (10 g) dans 100 ml d'eau stérile faiblement gélosée et en présence d'abrasif (0,5 $cm^3$ de « sable de Fontainebleau »); des dilutions en série font l'objet d'ensemencements « par coulage » et soumis, comme précédemment, aux diverses conditions de milieu nutritif et d'incubation.

Les nombres de germes (bactéries et levures présentes en tous conditionnements; spores des moisissures développées sur les seuls lots témoins) représentent la moyenne des comptages effectués en 3 boîtes de Pétri; ils sont alors rapportés à 1 g du support naturel.

Dans les deux méthodes, le milieu de base, pour l'isolement des champignons, reste l'extrait de malt (2 p. 100), gélosé auquel on peut ajouter du chlorure de sodium (6 p. 100) pour en accroître la pression osmotique (cf. isolement sélectif des espèces xérophiles) ou des antibiotiques (pénicilline + streptomycine) afin d'inhiber le développement de bactéries compétitives. Les bactéries sont globalement recensées sur « gélose-dénombrement ».

La durée de l'incubation (à 22 °C et, éventuellement, à 32 °C pour les échantillons stockés à 30 °C) varie de 4 à 10 jours selon les conditions de température et la nature des agents inventoriés (bactéries ou champignons) ou, parfois encore, en raison d'observations complémentaires pour confirmation.

Les deux procédés — qualitatif et quantitatif — peuvent se compléter en inventaire floristique; précisons toutefois ici que les champignons soumis à anaérobiose perdent vite leur aptitude à sporuler; dès lors, le contrôle numérique ne porte que sur les bactéries et les levures ou bien encore, sur les moisissures sporulées des lots témoins.

### 3. *Comportement corrélatif du substrat-grain*

#### a) *Faculté germinative des graines*

Exprimée en pourcentage, elle est évaluée par semis sur sable, conformément aux règles définies par l'Association Internationale des Essais de Semences (1976) : « Sable de Fontainebleau » humidifié à 40 p. 100 de sa capacité de rétention pour l'eau; incubation à 20 °C; exploitation à 7 jours; plus précisément, les plantules sont classées en « normales » ou « faibles et anormales » parallèlement aux semences « non germées ».

#### b) *Indice d'acide*

Il traduit la teneur en acides gras libres et est exprimé en mg d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser l'acidité libre d'un g de matière grasse (AFNOR, 1966); celle-ci, extraite à l'hexane, comporte d'ailleurs d'autres substances que l'huile.

c) *Teneur en protéines totales et solubles*

Elle est obtenue par la méthode de KJELDAHL, la teneur en azote étant affectée du coefficient 6,25. Pour les protéines solubles, le dosage porte sur le mélange de 2,7 g de tourteau et de 50 ml de NaOH à 0,2 p. 100, agité pendant une heure puis centrifugé (5 000 t /mn).

## Résultats

La multitude des données numériques appelle une transcription graphique; les résultats concernent parallèlement :

*Teneur en eau*

Les accroissements sont essentiellement fonction de la température (fig. 1).

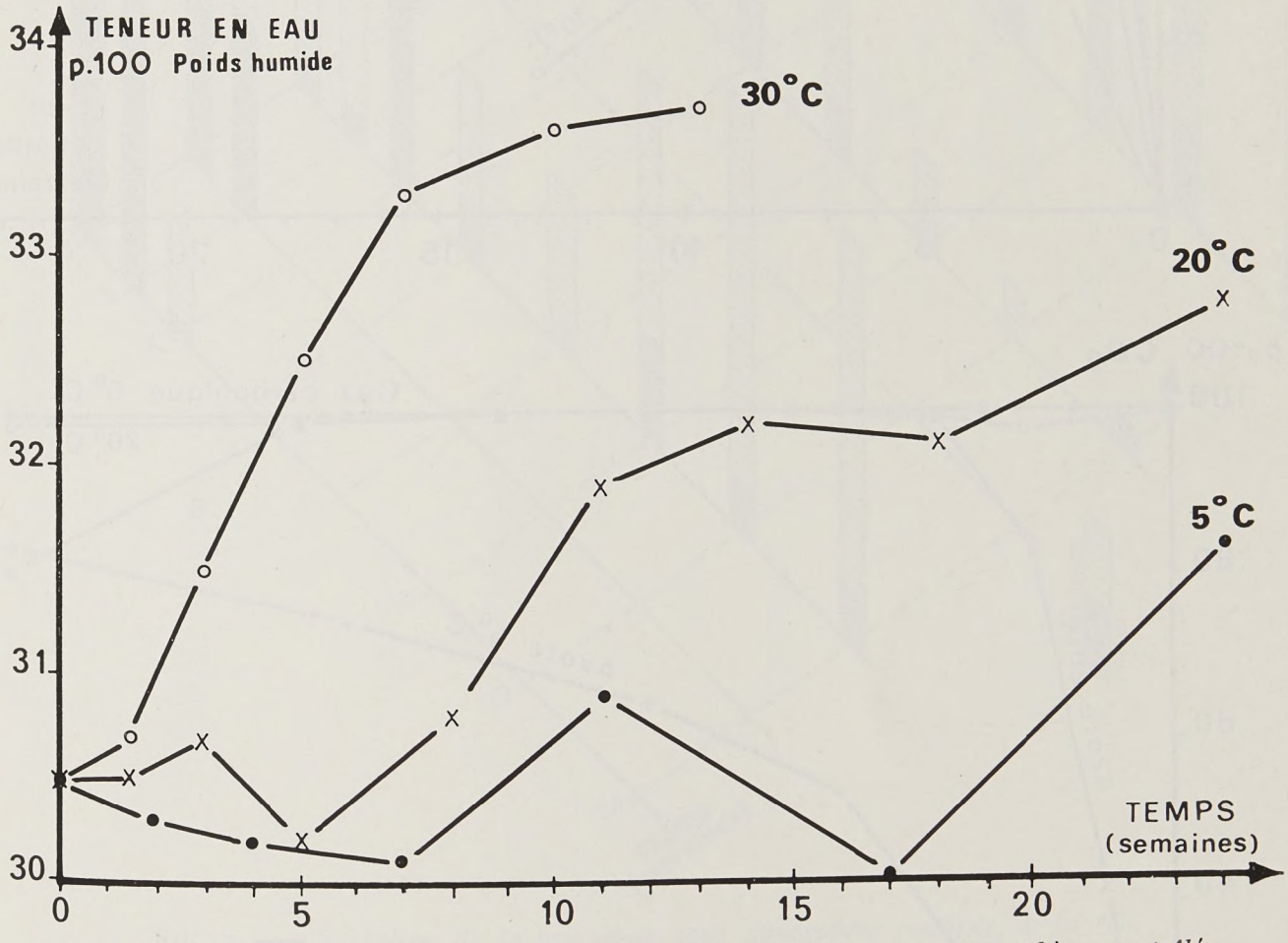
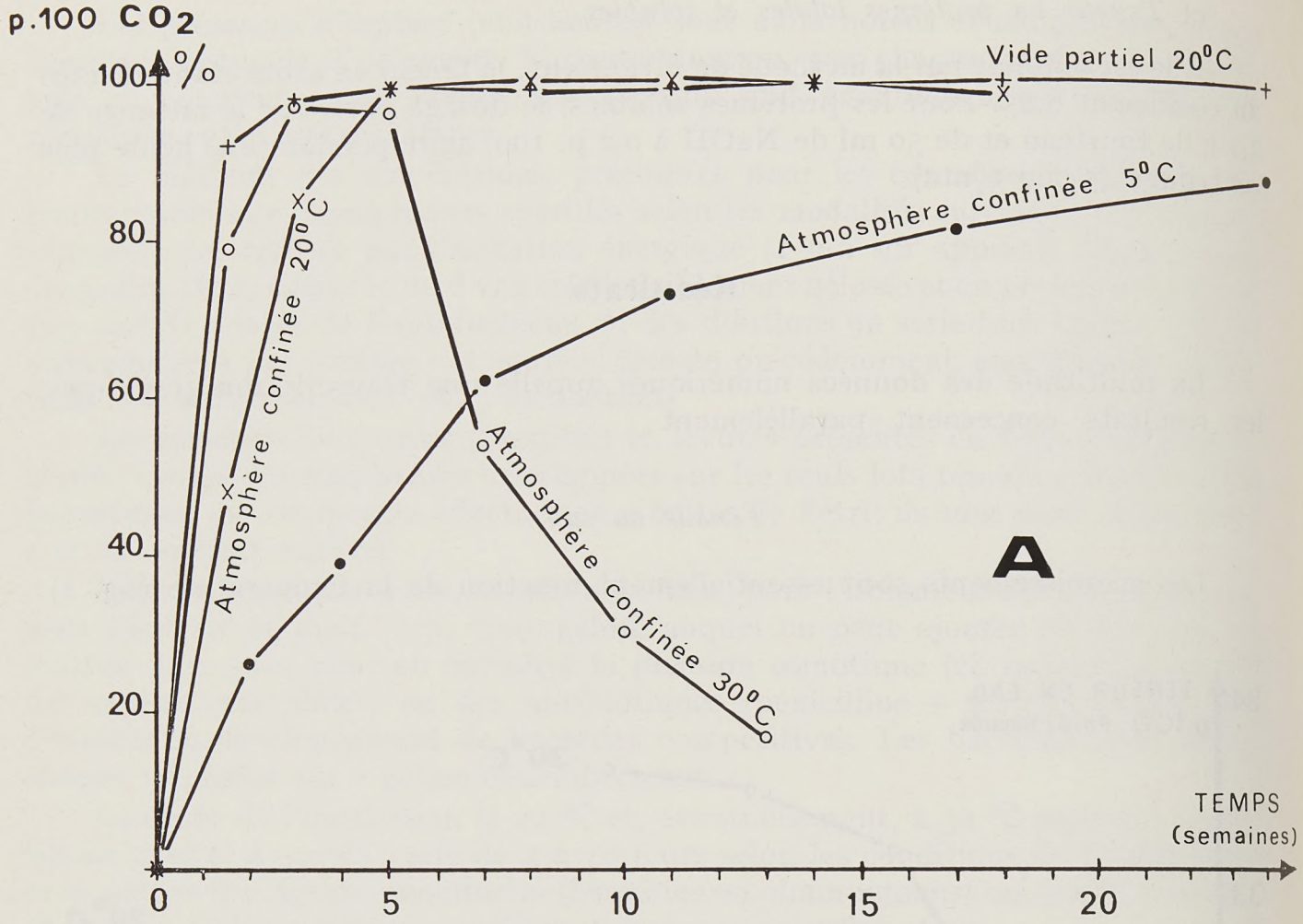
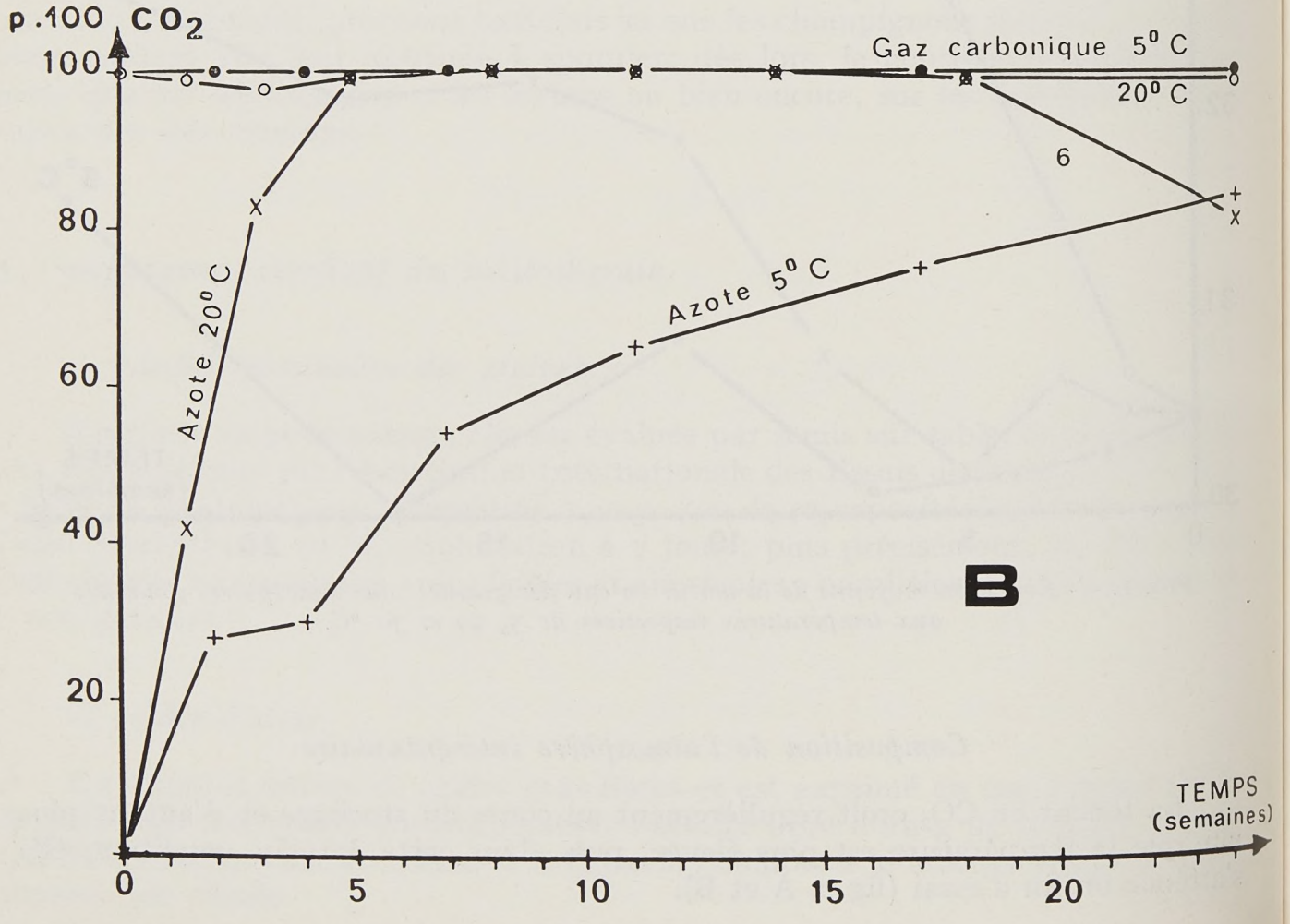



FIG. 1. — *Évolution moyenne de la teneur en eau des graines sous atmosphères contrôlées aux températures respectives de 5, 20 et 30 °C.*

*Composition de l'atmosphère intergranulaire*

La teneur en $CO_2$ croît régulièrement au cours du stockage et d'autant plus vite que la température est plus élevée; puis, dans cette dernière condition, elle s'atténue en fin d'essai (fig. 2 A et B).


p.100 $CO_2$
%
100
80
60
40
20
Vide partiel 20°C
Atmosphère confinée 5° C
Atmosphère confinée 20° C
Atmosphère confinée 30° C
A
TEMPS
(semaines)
0
5
10
15
20


p.100 $CO_2$
100
80
60
40
20
Gaz carbonique 5° C
20° C
6
Azote 5° C
Azote 20° C
B
TEMPS
(semaines)
0
5
10
15
20

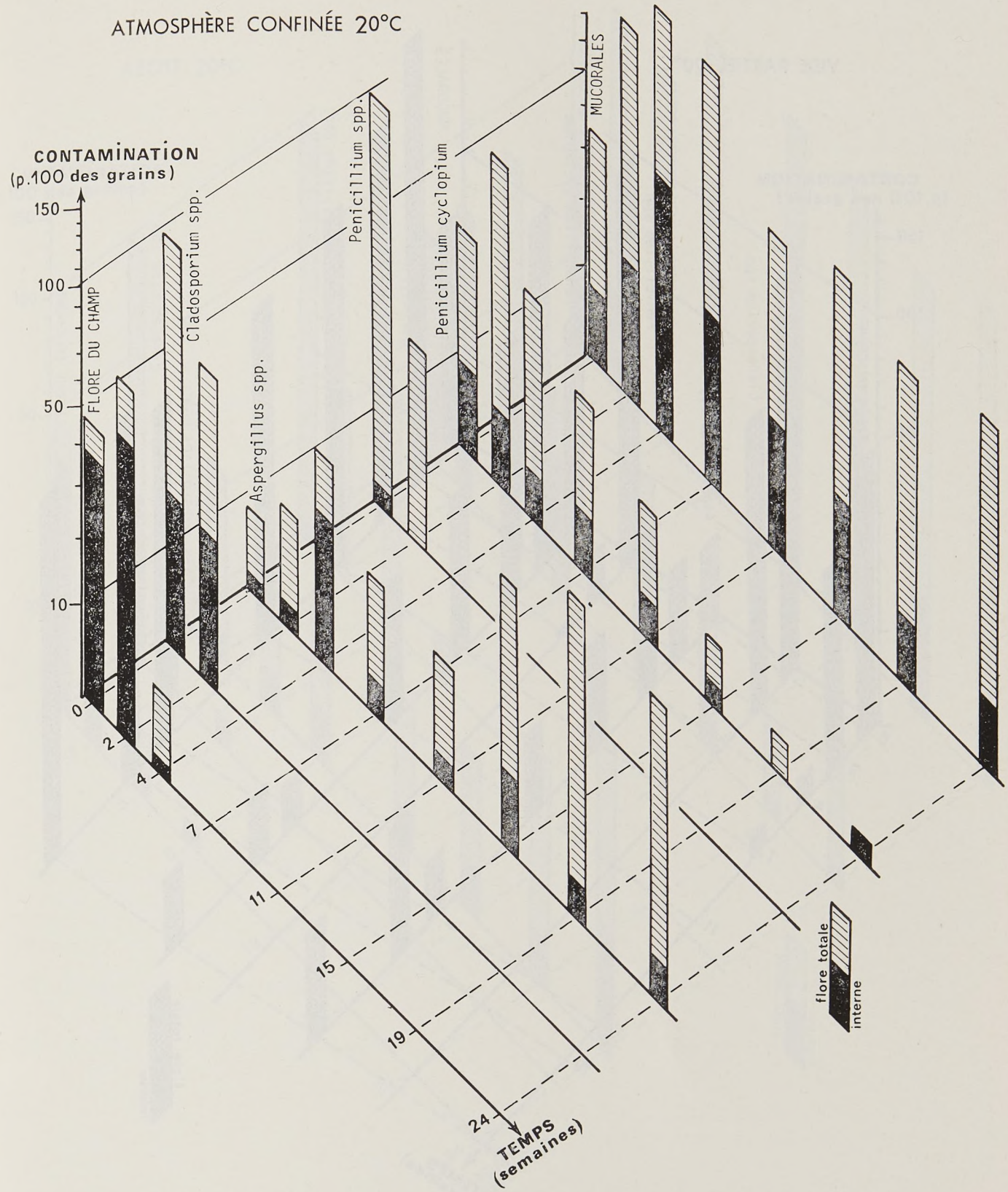



FIG. 3. — *Évolution de la mycoflore sous atmosphère confinée, à 20 °C.*

---

FIG. 2. — *Teneur en gaz carbonique de l'espace intergranulaire.*

A : sous atmosphère confinée (à 5, 20 et 30 °C) et sous vide partiel (à 20 °C).
B : après admission initiale de gaz carbonique ou d'azote (à 5 et 20 °C).

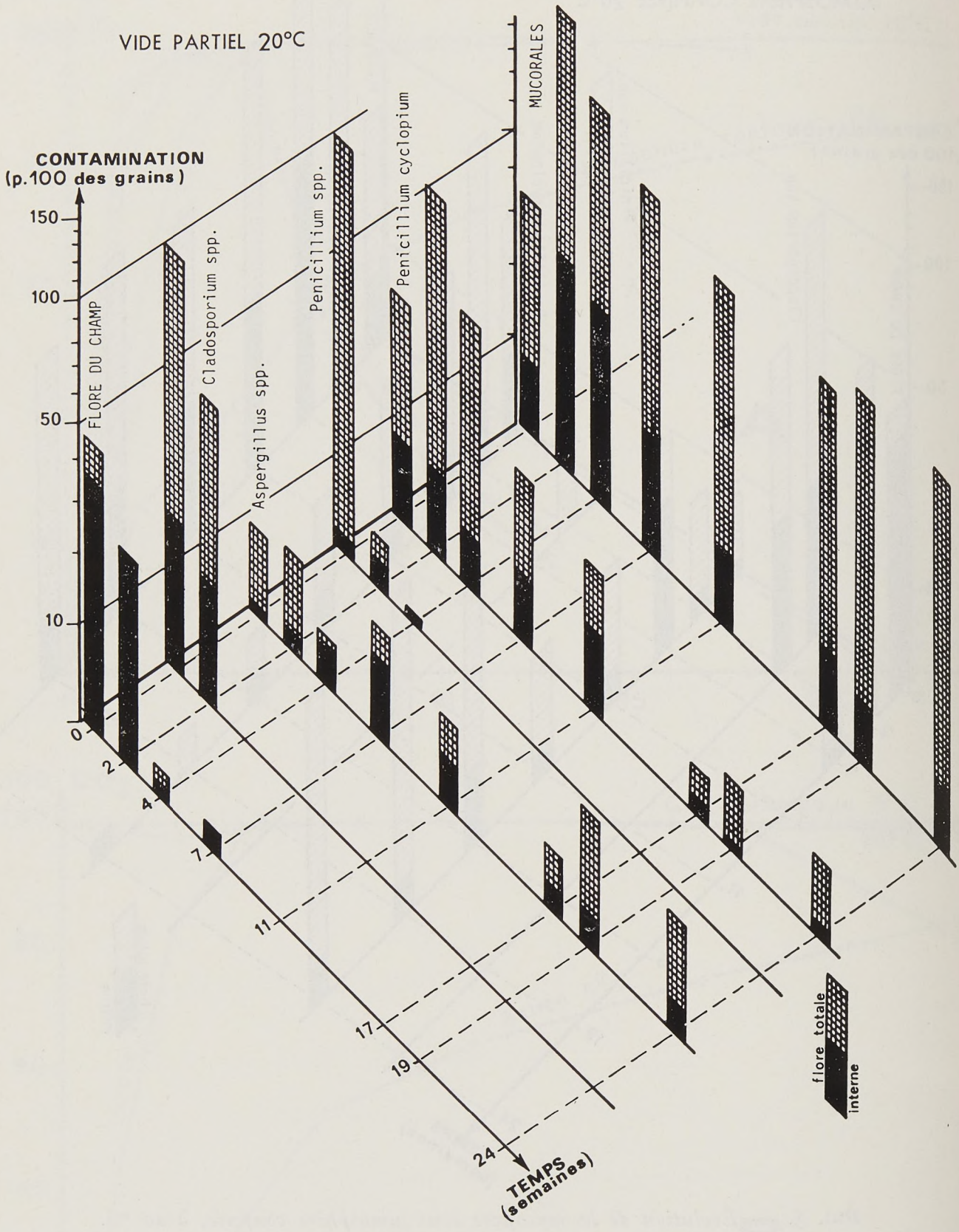



FIG. 4. — *Évolution de la mycoflore sous vide partiel, à 20 °C.*

## *Évolution de la microflore*

La contamination des graines par les champignons est traduite sur les figures 3 à 6.

Les numérations de germes révèlent d'une part : l'évolution des bactéries

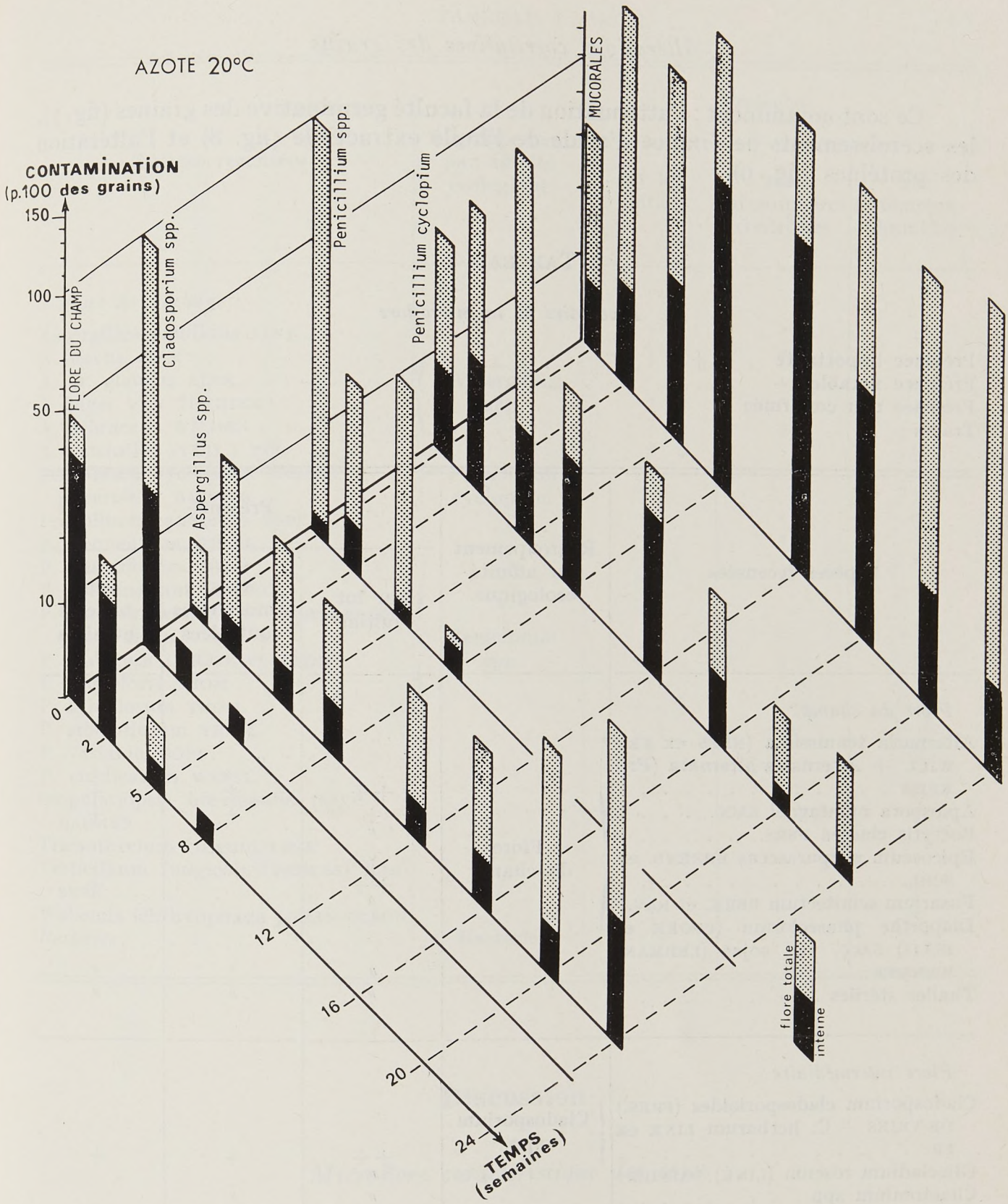



FIG. 5. — *Évolution de la mycoflore en présence d'azote, à 20 °C.*

et des levures dans les diverses conditions de l'essai et, d'autre part : le comportement de tous les éléments dominants de la flore, sur lots témoins.

Un regroupement des espèces, par affinité écologique, facilite l'exploitation des relevés floristiques opérés selon les deux procédés complémentaires (tabl. 1).

*Altérations corrélatives des grains*

Ce sont notamment : l'atténuation de la faculté germinative des graines (fig. 7), les accroissements de l'indice d'acide de l'huile extractible (fig. 8) et l'altération des protéines (fig. 9).

TABLEAU I

*Inventaire de la microflore*

Présence importante ++
Présence notable +
Présence non confirmée ?
Traces "

| Espèces recensées | Regroupement par affinité écologique | Présence | | |
|---|---|---|---|---|
| | | sur lot initial | sous atmosphères contrôlées | sur témoins humides |
| *Flore du champ :* | | | | |
| Alternaria tenuissima (NEES ex FR.) WILT. + Alternaria alternata (Fr.) KEISS | Flore du champ | ++ | + | + |
| Apiospora montagnei SACC. | | + | + | + |
| Botrytis cinerea PERS. | | " | | |
| Epicoccum purpurascens EHRENB. ex SCHL. | | ++ | | + |
| Fusarium semitectum BERK. et RAV. | | " | | |
| Diaporthe phaseolorum (COOKE et ELLIS) SACC. var. sojae (LEHMAN) WEHMER | | " | " | " |
| Thalles stériles | | " | " | " |
| *Flore intermédiaire :* | | | | |
| Cladosporium cladosporioides (FRES.) DE VRIES + C. herbarum LINK ex FR. | Cladosporium spp. | ++ | + | + |
| Gliocladium roseum (LINK) BAINIER. | | " | | |
| Chaetomium spp. | | " | " | |
| Actinomucor repens SCHOSTAK. | Mucorales | ? | " | |
| Mucor circinelloides VAN TIEGH. f. griseo-cyanus SCHIPPER | | ++ | ++ | ++ |
| M. hiemalis WEHMER | | ++ | ++ | ++ |
| M. racemosus FRES. | | ? | " | " |
| Rhizopus stolonifer (EHRENB. ex FR.) LIND | | ? | ++ | + |
| Sordaria fimicola CES. | | ? | " | |
| LEVURES (Hansenula sp., Candida sp., Endomycopsis sp.) | Levures | ? | ++ | + |

TABLEAU I (*suite*)

| Espèces recensées | Regroupement par affinité écologique | Présence | | |
|---|---|---|---|---|
| | | sur lot initial | sous atmosphères contrôlées | sur témoins humides |
| *Flore de ztockage :* | | | | |
| Aspergillus candidus LINK. . . . . | Aspergillus spp. | ? | " | + |
| A. flavus LINK. . . . . | | ? | " | + |
| A. gr. glaucus LINK. . . . . | | | + | + |
| A. niger VAN TIEGHEM . . . . . | | ? | " | + |
| A. ochraceus WILHEN . . . . . | | ? | + | ++ |
| A. versicolor (VUIL.) TIR. . . . . | | ? | | + |
| Penicillium cyclopium WESTL. + P. puberulum BAINIER . . . . . | Penicillium cyclopium | ++ | ++ | ++ |
| Penicillium canescens SOPP. . . . . | Penicillium spp. | ? | " | " |
| P. frequentans WESTL. . . . . | | ? | " | |
| P. funiculosum THOM . . . . . | | ? | | " |
| P. janthinellum BIOURGE . . . . . | | ? | " | |
| P. lanosum WESTL. + P. lanoso-coerulem THOM . . . . . | | ? | + | ++ |
| P. oxalicum CURRIE et THOM. . . . | | ++ | + | + |
| P. roqueforti THOM . . . . . | | ? | " | |
| P. spinulosum THOM. . . . . | | ++ | + | ++ |
| P. stoloniferum THOM. . . . . | | ++ | ++ | ++ |
| P. variabile SOPP. . . . . | | ? | | + |
| P. viridicatum WESTL. . . . . | | " | " | " |
| Scopulariopsis brevicaulis (SACC.) BAINIER . . . . . | | ? | | + |
| Trichothecium roseum LINK . . . . | | ? | | ++ |
| Verticillium fungicola (PREUSS) HASSEBR. . . . . | | ? | | + |
| Wallemia ichthyophaga JOHAN-OLSON | | ? | | + |
| *Bactéries*. . . . . | Bactéries | ++ | ++ | ++ |

## Discussion

### *Microflore caractéristique des sojas*

La flore initiale des lots témoins est très représentative de la contamination moyenne des sojas métropolitains (CARANTINO *et al.*, 1976); en particulier, on y retrouve les trois entités écologiques plus généralement reconnues sur grains après récolte (PELHATE, 1968*a*).

La « mycoflore des champs », banalisée par les deux dominantes habituelles (*Alternaria* spp. et *Epicoccum purpurascens*), reflète les conditions humides qui ont précédé la récolte; toutefois, les espèces parasites (*Fusarium* spp. et *Diaporthe phaseolorum*) restent très limitées.

La « flore intermédiaire », très abondante par ses composants essentiels

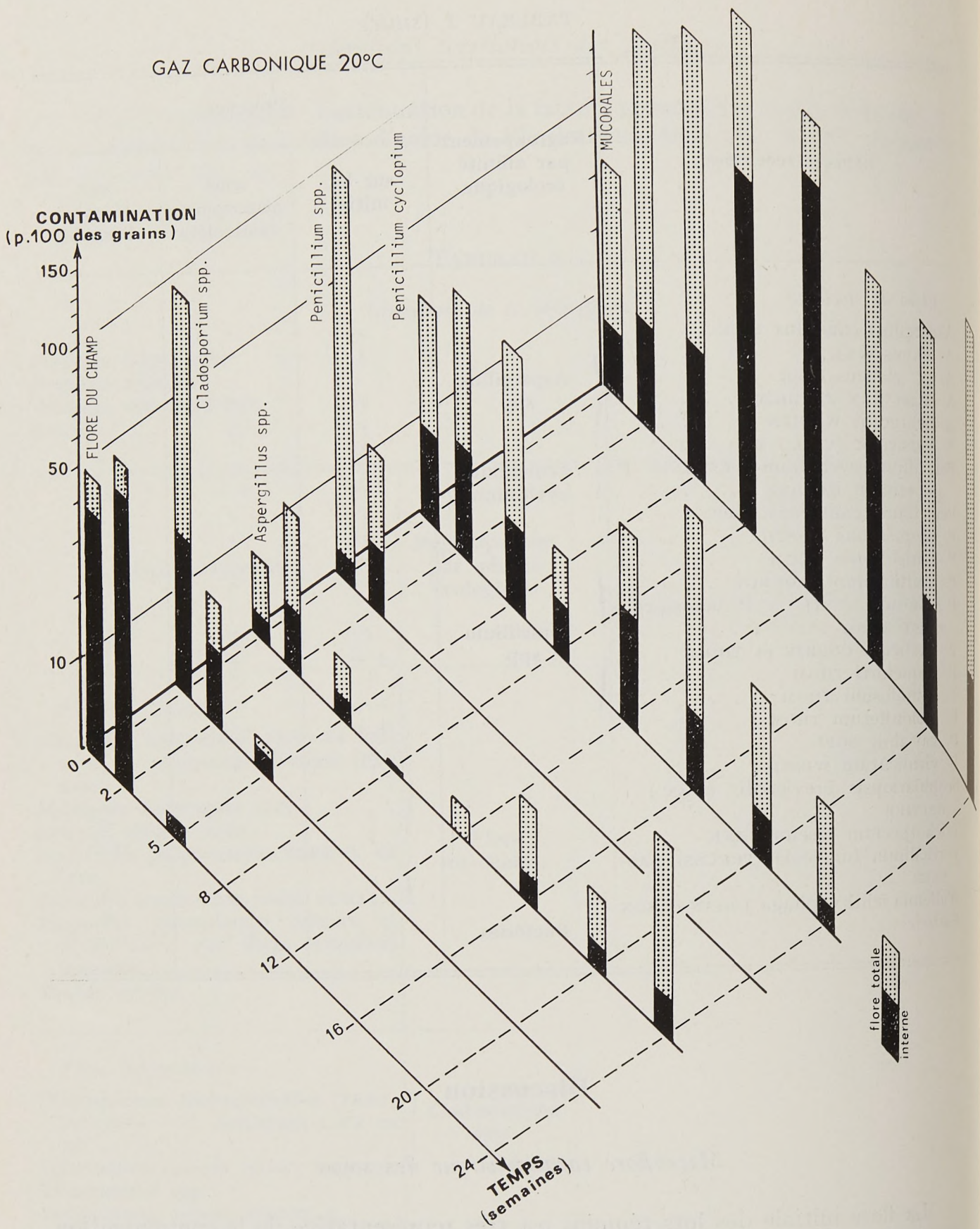



FIG. 6. — *Évolution de la mycoflore en présence de gaz carbonique, à 20 °C.*

(*Cladosporium* spp., mucorales et levures) apportera autant de critères d'évolution, tant par disparition des uns que par maintien ou croissance des autres.

La « flore de stockage » est elle-même représentée, notamment par des *Penicillium* et des *Aspergillus*. Les espèces afférentes au premier genre peuvent contaminer les sojas, comme les maïs d'ailleurs (PELHATE, 1978) avant récolte; tandis

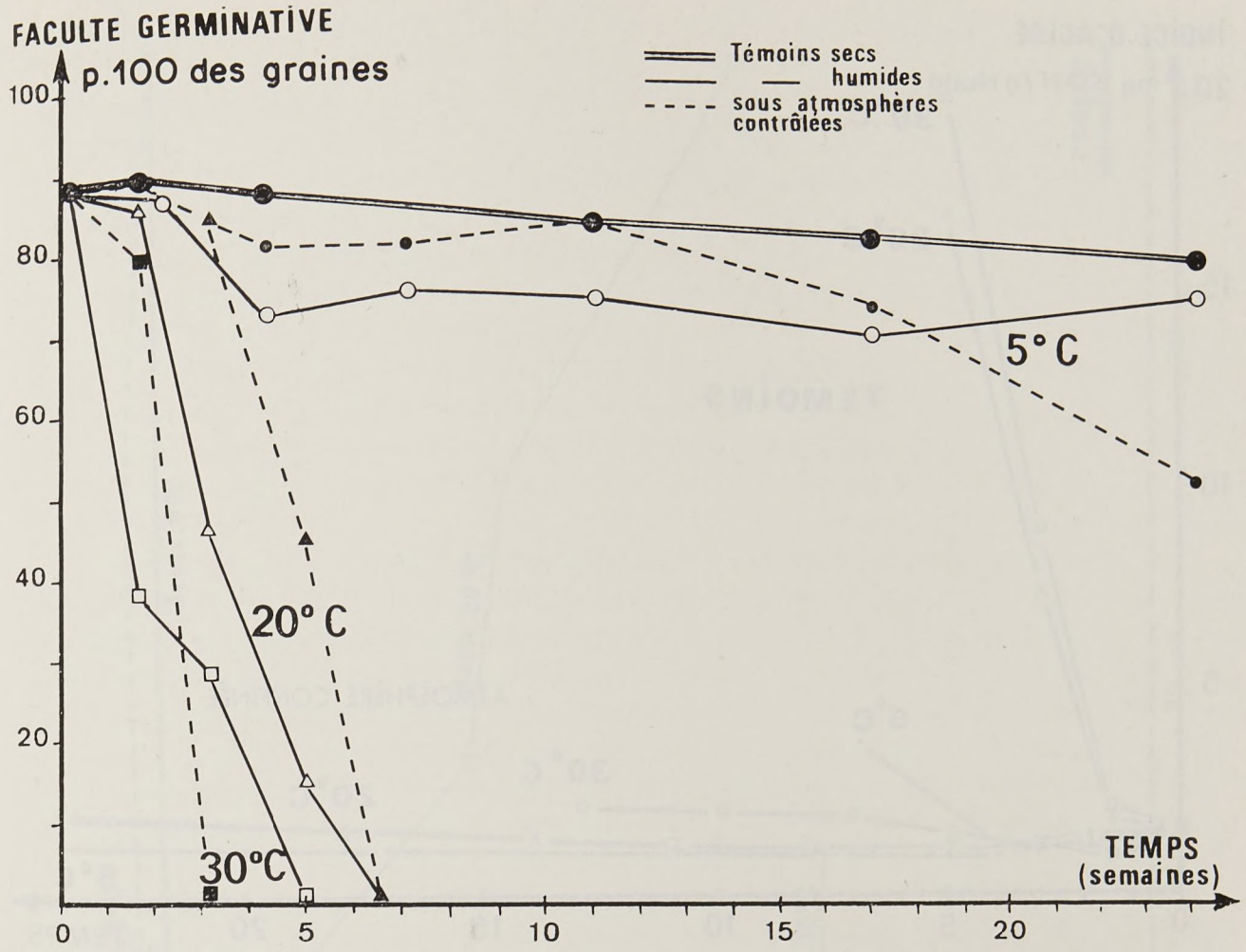



FIG. 7. — *Atténuation de la faculté germinative des graines. A température donnée, les comportements sous diverses atmosphères contrôlées sont semblables; ceux des lots témoins humides n'en diffèrent d'ailleurs que peu; l'effet température, très marqué sur graines humides, reste négligeable sur les témoins secs.*

que les espèces d'*Aspergillus*, d'abord non détectées, se révèleront au cours de l'essai; on connaît, chez ces deux types de moisissures, le remarquable potentiel infectieux à partir de spores disséminées dans l'énorme masse du substrat.

Enfin, les bactéries sont largement représentées dans les conditions de l'essai, sur graines très humides.

### *Évolution floristique*

Les divers paramètres contrôlés dans l'essai se révèlent plus ou moins déterminants.

#### 1. *Teneur en eau des grains*

Très élevée au départ, elle s'accroît encore en cours de conservation (fig. 1); cet excédent d'eau peut résulter, indirectement, de la formation de composés volatils entraînant la réduction de matière sèche ou de l'accroissement des microorganismes dont la propre substance est très riche en eau (PELHATE, 1968*b*).

Il reste que ces fluctuations ne risquent guère de modifier l'évolution floristique ou les transformations biochimiques corrélatives du substrat; en effet, le

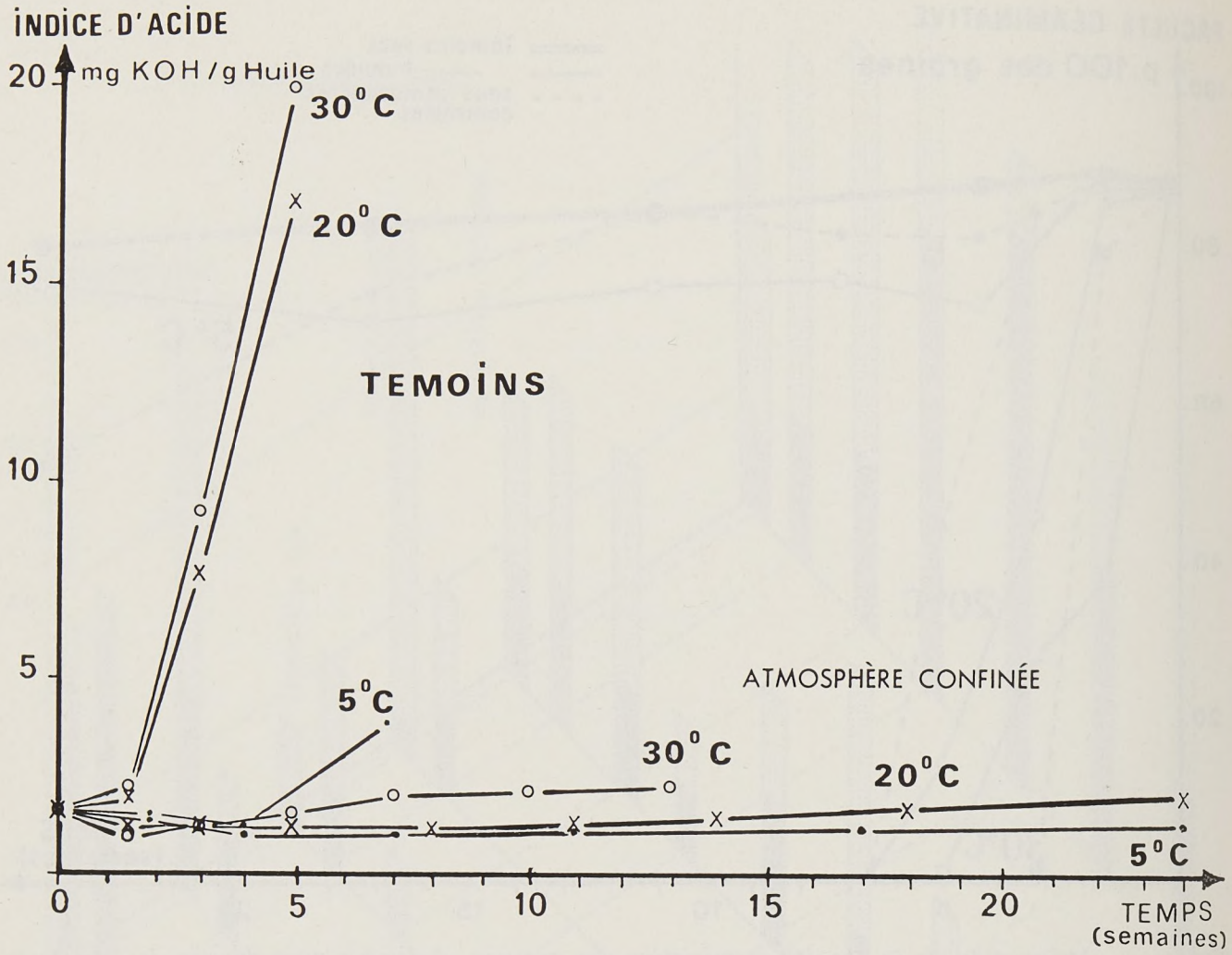



FIG. 8. — *Évolution des indices d'acide en cours de conservation sous atmosphère confinée.*

niveau hydrique initial, supérieur à l'équilibre de sorption en atmosphère saturée (ALAM et SHOVE, 1973; HUNT et PIXTON, 1974; CARANTINO *et al.*, 1976), tend simplement à favoriser les agents les plus hygrophiles, soit : bactéries, levures, mucorales et *Penicillium* spp. Mais le cortège floristique qui, en conditions habituelles de siccité relative des graines est d'abord déterminé par les variations hydriques, sera sélectionné, ici, par d'autres facteurs.

## 2. *Composition de l'atmosphère intergranulaire*

En dépit de l'effet recherché, elle varie beaucoup et dans le même sens, savoir : l'enrichissement plus ou moins rapide en $CO_2$ (fig. 2 A et B); cette production devient particulièrement tangible en atmosphère initiale d'azote (fig. 2 B).

Attendu que le gaz carbonique se trouve lié au métabolisme du complexe grain + microflore, la quantité formée dépend largement de la température de stockage; mais le bilan en est toutefois difficile à préciser quand on sait que les graines sont, elles-mêmes, capables d'absorber ou de relâcher ce gaz indépendamment des processus respiratoires (MASSON, 1966).

Ainsi, après les conditions initiales diversifiées, se substitue un type convergent d'anaérobiose aux deux aspects complémentaires et très caractéristiques des substrats organiques maintenus en atmosphère confinée : raréfaction de l'oxygène et enrichissement en gaz carbonique (HYDE, 1962; TABAK et COOKE, 1968*a*).

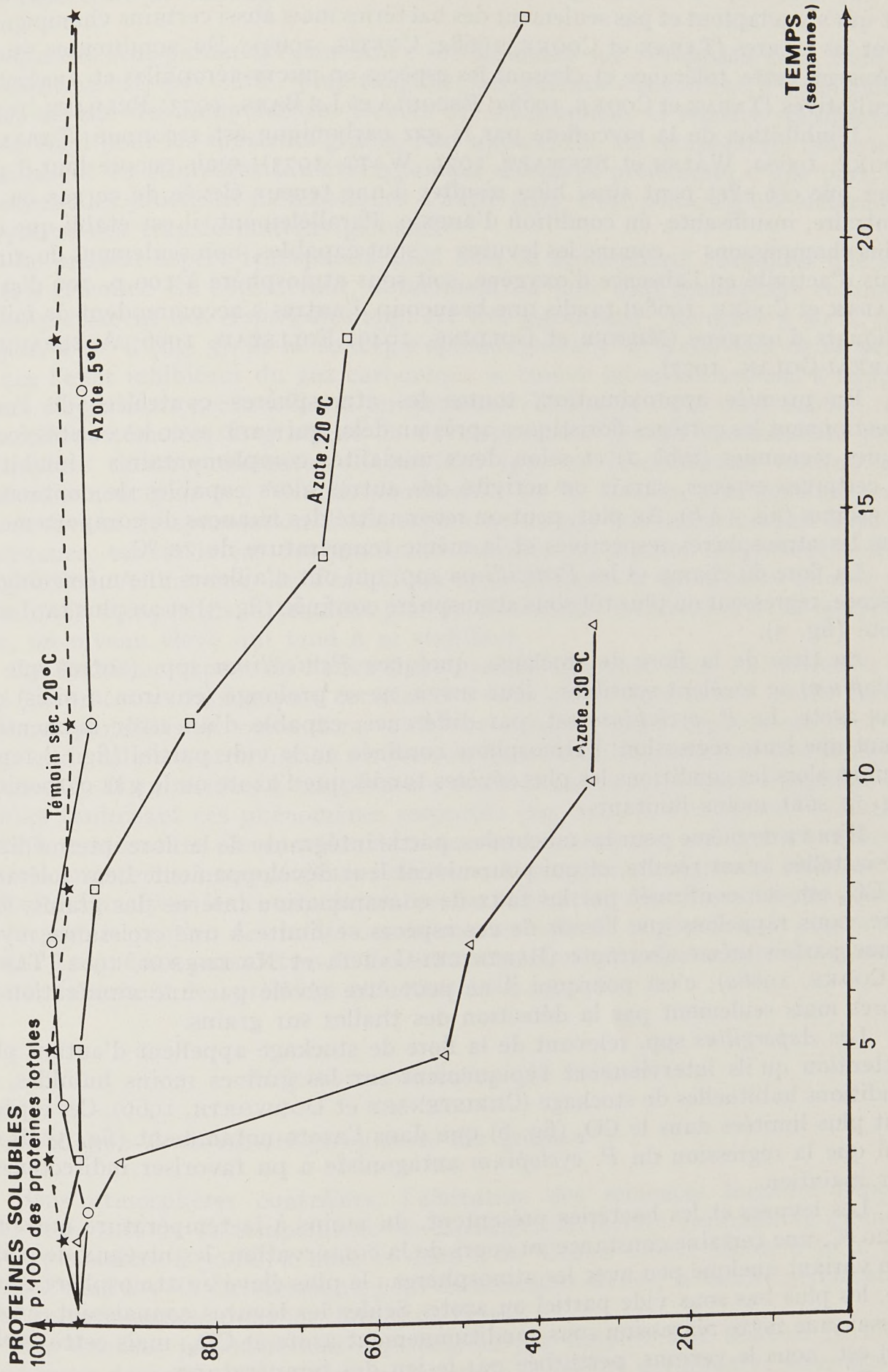



FIG. 9. — *Évolution comparée des protéines solubles en cours de conservation, sous atmosphère initiale d'azote (5, 20 et 30 °C) et sur témoin sec (# 10 p. 100 d'eau /poids humide) à 20 °C.*

Si beaucoup de micro-organismes sont limités en condition d'anaérobiose, il en est qui s'y adaptent et pas seulement des bactéries mais aussi certains champignons dont les levures (TABAK et COOKE, 1968*a*; CURTIS, 1969). De nombreuses études précisent cette tolérance et classent les espèces en micro-aérophiles et anaérobies facultatives (TABAK et COOKE, 1968*a*; ESCOULA et LE BARS, 1973; PELHATE, 1976).

L'inhibition de la mycoflore par le gaz carbonique est reconnue (TABAK et COOKE, 1968*a*; WALSH et STEWART, 1971; WATT, 1973); mais encore faut-il préciser que cet effet peut aussi bien résulter d'une teneur élevée de ce gaz ou, au contraire, insuffisante, en condition d'anoxie. Parallèlement, il est établi que certains champignons — comme les levures — sont capables, non seulement de survie mais d'activité en l'absence d'oxygène, soit sous atmosphère à 100 p. 100 d'azote (TABAK et COOKE, 1968*a*) tandis que beaucoup d'autres s'accommodent de faibles reliquats d'oxygène (MILNER et GOLDING, 1949; FOLLSTAD, 1966; APELBAUM et BARKAI-GOLAN, 1977).

En premiée approximation, toutes les atmosphères contrôlées de l'essai sélectionnent les cortèges floristiques après un délai qui varie avec les entités écologiques reconnues (tabl. 1) et selon deux modalités complémentaires : inhibition de certaines espèces, survie ou activité des autres alors capables de contaminer les graines (fig. 3 à 6). Au plus, peut-on reconnaître des nuances de comportements sous les atmosphères respectives et la même température de 20 °C.

La flore du champ et les *Penicillium* spp. qui ont d'ailleurs une même origine précoce, régressent au plus tôt sous atmosphère confinée (fig. 3) et au plus tard sous azote (fig. 5).

Au titre de la flore de stockage, quelques *Penicillium* spp. (autres que *P. cyclopium*) se révèlent sensibles : leur survie ne se prolonge (environ 2 mois) que sous azote. Le *P. cyclopium* est, par différence, capable d'un essor momentané avant une lente régression; l'atmosphère confinée ou le vide partiel (fig. 4) représentent alors les conditions les plus sévères tandis que l'azote ou le gaz carbonique (fig. 6) sont moins limitants.

Il en va de même pour les mucorales, partie intégrante de la flore intermédiaire pré-installée avant récolte, et qui poursuivent leur développement. Leur tolérance au $CO_2$ est, ici, confirmée par les taux de contamination interne des grains; à ce titre, nous rappelons que l'essor de ces espèces se limite à une croissance mycélienne parfois même aberrante (BARTNICKI-GARCIA et NICKERSON, 1962; TABAK et COOKE, 1968*a*); c'est pourquoi il ne peut être révélé par une numération de spores mais seulement par la détection des thalles sur grains.

Les *Aspergillus* spp. relevant de la flore de stockage appellent d'autant plus l'attention qu'ils interviennent typiquement sur les graines moins humides, en conditions habituelles de stockage (CHRISTENSEN et DORWORTH, 1966). Ces espèces sont plus limitées dans le $CO_2$ (fig. 6) que dans l'azote notamment (fig. 5). Il est vrai que la régression du *P. cyclopium* antagoniste a pu favoriser indirectement leur maintien.

Les levures et les bactéries présentent, du moins à la température moyenne de 20 °C, une certaine constance au cours de la conservation, les niveaux de pollution variant quelque peu avec les atmosphères : le plus élevé en atmosphère confinée, les plus bas sous vide partiel ou azote. Seules les levures connaissent, en fin d'essai, une nette régression sous conditionnement azote et $CO_2$; mais cette évolution est, nous le verrons, perturbée par le jeu des températures.

Enfin, diverses espèces capables d'un grand développement sur les échantillons témoins (*Trichothecium roseum, A. ochraceus, P. lanosum*...) sont peu ou pas décelables sous atmosphères contrôlées.

3. *Température de stockage*

C'est le seul paramètre constant : son influence sur l'évolution de la flore et du substrat est, par suite, plus tangible; les auteurs s'accordent à reconnaître l'effet néfaste des températures élevées et, inversement, la relative stabilisation par le froid pour les substrats grains, tous apparentés. La température intervient doublement en stimulant le développement d'espèces préférentes d'une part, en accélérant les processus métaboliques d'autre part; c'est pourquoi elle détermine le rythme des transformations globales.

Le premier aspect transparaît aussi bien en atmosphères contrôlées que sur les lots témoins. En considérant, notamment, la flore sous atmosphère confinée, le comportement des *Aspergillus* spp. est très significatif : favorisés à 30 °C par rapport à 20 °C (fig. 3), ils ne sont que sporadiques à 5 °C; il convient de rappeler ici que l'effet inhibiteur du gaz carbonique se trouve lui-même atténué à température élevée mais accru à basse température (Tabak et de Cooke, 1968*a*). Sur échantillons témoins, le gradient de développement devient spectaculaire pour les espèces thermopréférentes (*Aspergillus* spp. et *Trichothecium roseum*) qui n'interviennent plus à 5 °C mais dominent à 30 °C. Notons, plus généralement, que le niveau de sporulation d'une espèce ne va pas forcément de pair avec sa persistance, tel est le cas des mucorales ou celui des levures supportant mal la compétition. A l'inverse, les *Penicillium* spp., éléments à sporulation intense et, de surcroît, compétitifs, atteignent plus ou moins vite, en fonction de la température, un niveau élevé qui tend à se stabiliser.

Le deuxième aspect de l'effet thermique se répercute dans l'accélération de tous les processus biologiques corrélatifs : essor de la flore active totale, métabolismes parallèles de cette flore et de son substrat (avec dégagement de $CO_2$, d'eau et de calories, atténuation du pouvoir germinatif, dégradations biochimiques diverses...). Il en résulte, à température donnée, une superposition frappante des courbes traduisant ces phénomènes respectifs (fig. 1, 2, 7, 8 et 9); et l'évolution notée à température élevée peut, dans une certaine mesure, préfigurer le devenir des lots maintenus à température inférieure. Une autre conséquence, enfin, est la difficulté d'analyser les causes premières de l'altération du substrat-grain : quelle est la part respective des micro-organismes et celle de la physiologie propre des grains? Les mêmes paramètres de l'environnement et, principalement ici, la température, favorisent les premiers et activent la seconde.

## *Altérations corrélatives du substrat*

1. *Atténuation de la faculté germinative des grains*

Sous atmosphères contrôlées, l'altération des semences humides dépend essentiellement de la température de stockage; la faculté germinative s'annule après 3 semaines à 30 °C, 1 mois et demi à 20 °C mais s'élève encore à 50 p. 100 en fin d'essai à 5 °C. Inversement, pour les semences sèches, la faculté germinative n'est guère modifiée, dans les limites de l'essai.

Ces données prennent leur signification par rapport aux témoins humides rapidement dégradés; le meilleur maintien de la faculté germinative sous atmosphères contrôlées est imputable à l'anoxie et au gaz carbonique (Masson, 1969) soit directement en inhibant le métabolisme des grains, soit indirectement en limitant le développement de la microflore (Pelhate et Gallou, 1977).

2. *Indice d'acide de l'huile extractible*

Si la température constitue encore le paramètre le plus décisif de l'acidité en conditions habituelles de stockage, les atmosphères contrôlées limitent nettement cet effet (fig. 8); on peut alors penser que les moisissures le plus souvent impliquées dans le processus (*Penicillium* spp. et surtout *Aspergillus* spp.) soient, ici, inhibées tandis que bactéries, levures et mucorales restent les dominantes sous atmosphères « contrôlées » et uniformément chargées de gaz carbonique. Ainsi, la qualité de l'huile est-elle maintenue pendant la durée de l'essai (à 5 et 20 °C) et pendant 3 mois (à 30 °C).

3. *Qualité des protéines*

La conservation des grains très humides, sous atmosphères contrôlées, ne garantit pas aussi bien la valeur protéique. Si l'on traduit celle-ci par le pourcentage des protéines solubles par rapport aux protéines totales (fig. 9), il apparaît, par comparaison avec le témoin sec, que la qualité des protéines ne se maintient guère que deux semaines à 30 °C, 2 mois à 20 °C et pendant la durée de l'essai à 5 °C; ainsi se trouve confirmé l'effet stabilisateur des températures basses.

## Conclusion

Le nombre de conditions réalisées par le jeu des atmosphères contrôlées et des températures pouvait faire présager des comportements aussi diversifiés du substrat et de sa flore épiphyte d'autant que les graines de soja comportaient une flore initiale variée et d'ailleurs analogue à celle d'autres grains immatures comme les maïs (PELHATE, 1978).

Or, la forte humidité du substrat estompe les autres paramètres; un métabolisme actif du complexe graines + microflore, générateur de gaz carbonique, uniformise les atmosphères contrôlées de sorte que l'anaérobiose spontanée, en milieu confiné, n'est pas sensiblement améliorée par adjonction de gaz inertes ou par le vide partiel; on rejoint ainsi la conclusion de travaux analogues, réalisés sur d'autres grains (JUSTICE et BASS, 1978).

Dans ces conditions, l'anaérobiose sélectionne la flore séminicole dont l'essor éventuel est essentiellement dépendant de la température; des entités floristiques disparaissent (flore initiale « du champ » et *Cladosporium* spp.), d'autres se maintiennent sans qu'il soit facile de préciser leur état physiologique (simple survie ou activité métabolique). Mucorales, levures et bactéries sont, en tout cas, les éléments les plus durables et probablement les plus impliqués dans l'altération du substrat.

L'évolution de la flore, traduite par les numérations de « germes » (bactéries et spores de moisissures) ou, mieux, par les taux de contamination des graines, est corrélative de la qualité biologique (faculté germinative), technologique (indice d'acide de l'huile) ou alimentaire (valeur des protéines...) de celles-ci. Notons bien que d'autres critères (pertes en matière sèche, sucres...) permettraient de préciser la condition des graines stockées.

Nous retiendrons, dans ce sens, que la conservation des sojas très humides, en anaérobiose même imparfaite et progressive (comme en ambiance confinée), assure une protection de l'huile extractible, mais non des protéines.

Les limites du procédé tiennent à deux conditions : limitation de la teneur en eau des graines et modération de la température. Sans doute, alors, l'adjonction de gaz carbonique à l'ambiance confinée serait-elle plus efficiente.

Dans ces conditions, deux modalités d'application pratique sont envisageables : préstockage de courte durée, avant séchage, conservation plus ou moins durable mais dans les limites de sauvegarde des qualités technologiques et alimentaires.

*Reçu pour publication en mai 1979.*

## Summary

*Preservation test of high moisture soybean grains in controlled astmospheres*

The behaviour of high-moisture soybean grains in various controlled atmospheres (confined air, partial vacuum, nitrogen and carbon dioxide) and at 3 temperature levels (5, 20 and 30 °C) were followed during 6 months and compared with aerated controls.

Microflora's evolution is correlated with grains' quality checked on the biological (germination capacity) and technological (soluble protein and acid number) aspects.

In spite of the fact that there were many differing conditions on departure, the high level of grains moisture favored an activated metabolism and a high activity of their microflora; atmosphere's composition was then dominated by carbon dioxide.

An ecological determinism resulted from that: it was dominated by anaerobiosis; in those conditions, floristic cortege simplified in a few microaerobic species (*Penicillium* spp. and Mucorales), development of which is related to temperature.

Practical transposition of results thus requires some arrangements: lowering of water content and temperature, reduction of storage time according to these parameters.

Key words: *soybean, Glycine max, high-moisture grains, anoxy, controlled atmosphere, storage, microflora, oleaginous.*

## Références bibliographiques

A.F.N.O.R., 1966. Graines oléagineuses. Détermination de l'acidité de l'huile. *NF V*, 03-906, 3 p.

Alam A., Shove G. C., 1973. Hygroscopicity and thermal properties of soybeans. *Trans. Amer. Soc. Agr. Eng.*, **16** (4), 707-709.

Apelbaum A., Barkai-Golan R., 1977. Spore germination and mycelial growth of postharvested pathogens under hypobaric pressures. *Phytopathology*, **67** (3), 400-403.

Association internationale d'essais de semences, 1976. Règles internationales pour les essais de semences. *Seed. Sci. Technol.*, **4**, 557-743.

Bartnicki-Garcia S., Nickerson W. J., 1962. Induction of yeastlike development in Mucor by carbon dioxide. *J. Bacteriol.*, **84**, 829-840.

Carantino S., Cahagnier B., Desserme C., Poisson J., Baudet J. J., Burghart P., Chanet M., 1976. Conservation des graines de sojas métropolitaines : évaluation de leur microflore en fonction des conditions de stockage et de la date de la récolte. *Informations Techniques (C.E.T.I.O.M.)*, **50**, 1-24.

Cristensen C. M., Dorworth C. E., 1966. Influence of moisture content, temperature and time on invasion of soybeans by storage fungi. *Phytopathology*, **56** (4), 412-418.

Curtis P. J., 1969. Anaerobic growth of fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **53** (2), 299-302.

Escoula L., Le Bars J., 1973. Études sur la mycoflore des ensilages. II. Croissance d'espèces fongiques en anaérobiose. *Ann. Rech. Vét.*, **4** (2), 253-264.

Follstad N. M., 1966. Mycelial growth rate and sporulation of *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* and *Rhizopus stolonifer* in low oxygen atmospheres. *Phytopathology*, **56** (9), 1098-1099.

GILMAN J. C., SEMENIUK G., 1948. Mold microflora in stored grain and its role in the deterioration process. *Trans. Amer. Assoc. Cer. Chemists*, **6**, 108-112.

HUNT W. H., PIXTON S. W., 1974. Moisture — its significance, behavior and measurement. In: *Storage of cereal grains and their products*. Christensen C. M. éd. *Amer. Assoc. Cer. Chemists*, ch. I, 1-55.

HYDE M. B., 1962. Airtight storage of grain. *Ann. Appl. Biol.***50** (2), 362-364.

HYDE M. B., 1974. Airtight storage. In: *Storage of cereal grains and their products*. Christensen C. M. éd. *Amer Assoc. Cer. Chemists*, Ch. 10, 383-419.

JUSTICE O. L., BASS L. N., 1978. *Principles and practices of seed storage*. Agricultural Handbook n° 506, USDA, 289 p.

MASSON C. G., 1963. La conservation des oléagineux en atmosphère confinée ou gazeuse. *Oléagineux*, **2**, 89-95.

MASSON C. G., 1966. Conservation des graines oléagineuses métropolitaines en atmosphère artificielle. *Journée d'étude sur l'altération des graines oléagineuses, moyens d'y remédier et conséquences*. C. R. Journées d'étude, Institut des Corps Gras, Paris, 29-44.

MASSON C. G., 1969. Le comportement de certaines graines oléagineuses en atmosphère de gaz carbonique *Doc. C.E.T.I.O.M.*, Paris, 184 p.

MILNER D. D., GOLDING N. S., 1949. The gas requirements of molds. V. The minimum oxygen requirements for normal growth and germination of six mold cultures. *J. Dairy Science*, **32**, 101-110.

MOSELEY Y. C., MANBECK H. B., BARNES G. L., NELSON G. L., 1971. Controlled atmosphere for short-duration storage of peanuts before drying. *Trans. Amer. Soc. Agr. Eng.*, **14** (2), 206-210.

PELHATE J., 1968*a*. Inventaire de la mycoflore des blés de conservation. *Bull. Soc. Mycol. Fr.*, **84** (1), 127-143.

PELHATE J., 1968*b*. État thermodynamique de l'eau dans les grains de blés sains ou altérés. *Ann. Technol. Agric.*, **17** (3), 227-236.

PELHATE J., 1970. Analyses mycologiques systématiques d'aliments suspects. *Cahiers Nutr. Diét.*, V (2), 75-77.

PELHATE J., 1976. Mycoflore des maïs humides; déterminisme de son évolution. *Bull. O.E.P.P. Paris*, **6**, 91-100.

PELHATE J., 1978. Mycoflore séminicole des maïs. I. Contamination avant récolte. *Rev. Mycol.* (sous presse).

PELHATE J., GALLOU J., 1977. Incidence de la mycoflore des semences sur la qualité germinative. *C. R. 96e Congrès A.F.A.S. Rennes : section* **15**, 1-13.

PETERSON A., SCHLEGEL V., HUMMEL B., CUENDET L. S., GEDDES W. A., CHRISTENSEN C. M., 1956. Grain storage studies. XXII. Influence of oxygen and carbon dioxide concentrations on mold growth and grain deterioration. *Cer. Chem.*, **33**, 53-66.

POISSON J., 1960. Conservation du grain en silos étanches. *Ann. Technol. Agric.*, **2**, 117-137.

RICHARD-MOLARD D., CAHAGNIER B., POISSON J. et DRAPRON R., 1976. Évolutions comparées des constituants volatils et de la microflore de maïs stockés sous différentes conditions de température et d'humidité. *Ann. Technol. Agric.*, **25** (1), 29-44.

TABAK H. H., COOKE W. B., 1968*a*. The effects of gaseous environments on the growth and metabolism of fungi. *Bot. Rev.*, **34** (2), 126-252.

TABAK H. H., COOKE W. B., 1968*b*. Growth and metabolism of fungi in an atmosphere of nitrogen. *Mycologia*, **60** (1), 115-140.

WALSH J. H., 1969. A method for the convenient preparation of artificial gas mixtures in closed containers. *Int. Biodtn. Bull.*, **5** (4), 149-152.

WALSH J. H., STEWART C. S., 1971. Effect of temperature, oxygen and carbon dioxide on cellulolytic activity of some fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **57** (1), 75-84.

WATT B., 1973. The influence of carbon dioxide on the growth of obligate and facultative anaerobes on solid media. *J. Med. Microbiol.*, **63** (3), 307-314.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (2), 243-253.

# Influence de l'extrusion et de l'agglomération du manioc sur l'état de son amidon et sur la consommation de l'urée *in vitro* par les microorganismes du rumen

J. L. BARRY, Michelle DURAND (*) et J. DELORT-LAVAL

Avec la collaboration technique de
Christiane DUMAY (*) et P. BEAUMATIN (*)

*Laboratoire de Technologie des Aliments des Animaux, I.N.R.A.,*
*Centre de Recherches de Nantes,*
*44072 Nantes Cedex*
(*) *Station de Recherches de Nutrition, I.N.R.A.,*
*Centre de Recherches de Jouy-en-Josas,*
*78350 Jouy-en-Josas*

---

## Résumé

L'extrusion de cossettes séchées et broyées de racines de manioc (*Manihot utilissima* Pohl) à différentes températures accroît leur fraction d'amidon facilement attaquable par une α-amylase bactérienne (F) de 4 à 72 p. 100 et la dégradation de cet amidon en milieu de rumen *in vitro* en présence de 4 ou 8 p. 100 d'urée. La solubilité, en milieu salin 0,15 M, de l'urée mélangée à l'amidon avant traitement n'est pas durablement réduite par l'extrusion. La seule agglomération du mélange augmente très sensiblement F (de 4 à 70 p. 100) et la dégradation de l'amidon du manioc par la microflore du rumen *in vitro* en présence de 4 p. 100 d'urée.

En accroissant le taux d'amidon du manioc aisément dégradable dans le rumen, son agglomération est susceptible de valoriser cette source peu coûteuse d'énergie et d'accroître les possibilités d'utilisation de l'azote non protéique dans l'alimentation du ruminant.

Mots clés : *manioc, traitement hydrothermique, utilisation de l'urée, ruminant.*

---

## Introduction

Pour constituer une source efficace d'azote non protéique pour la microflore du rumen, l'urée doit être incorporée dans un régime à faible teneur en azote soluble et riche en glucides rapidement fermentescibles. A cet égard, il a été

observé, tant *in vivo* qu'*in vitro*, que divers traitements hydrothermiques des céréales, en augmentant la sensibilité de leur amidon à l'alpha-amylase bactérienne, accroissent la consommation de l'urée par la microflore (STILES *et al.*, 1970; DURAND, BEN AMEUR et VIROBEN, 1974; BORGIDA, DURAND et DELORT-LAVAL, 1976), lorsque la quantité d'urée incorporée à la céréale n'est pas excessive. Au-delà d'un certain optimum, le rendement de la synthèse protéique varie en raison inverse de la proportion d'urée dans l'aliment traité.

Parmi les amylacés disponibles en grande quantité sur le marché, la racine de manioc (*Manihot utilissima* Pohl), riche en amidon (80 p. 100 de la matière sèche), pourrait représenter une source privilégiée d'énergie pour la microflore de la panse. Toutefois, lorsqu'il est seulement soumis à un séchage à l'air libre, cet aliment ne semble pas apte à assurer une bonne valorisation de l'urée pour la croissance du taurillon (SHULTZ *et al.*, 1970). Par contre, un traitement même peu intense, comme l'agglomération à la vapeur accroît la sensibilité des amidons tropicaux, aux amylases microbiennes (SZYLIT *et al.*, 1978). De même, après cuisson sous pression à l'autoclave à 170 °C pendant 4 heures, un mélange de manioc à 8,3 p. 100 d'urée provoque, chez l'agneau, par rapport au témoin non traité, un abaissement de la concentration maximale d'ammoniac au niveau du rumen et une augmentation de la rétention azotée (SHULTZ, SHULTZ et CHICCO, 1972). Pour mieux connaître l'effet des conditions de divers traitements technologiques du manioc pour le ruminant, nous avons soumis des cossettes sèches de ce tubercule à un traitement simple — l'agglomération à sec — ou plus sophistiqué — l'extrusion à différentes températures — et recherché dans quelle mesure l'altération de l'amidon améliorait l'utilisation *in vitro* de l'urée par la microflore du rumen.

## Matériel et méthodes

### 1. — *Traitements technologiques du manioc*

Des cossettes sèches de manioc ont été divisées dans un broyeur à marteaux, muni d'une grille à perforations de 2,5 mm de diamètre, puis soumises à un traitement d'extrusion ou d'agglomération.

L'extrusion a été effectuée dans un appareil Creusot-Loire BC 45, muni d'une filière de 4 mm selon le principe de marche décrit par MERCIER et FEILLET (1975). La température de l'enveloppe de la vis d'extrusion, dans sa partie terminale, était réglée à 85 °C ou 220 °C. Le traitement a porté sur le manioc seul ou additionné de 4 ou 8 p. 100 d'urée; l'adjonction d'eau (5 p. 100) ou d'urée accroissait le débit de l'appareil. L'agglomération a été effectuée à sec sur presse de laboratoire (California Pellet Mill, 2,5 CV) en granulés de 5 mm de diamètre, la température de sortie des agglomérés s'élevant aux environs de 75 °C.

### 2. — *Caractérisation physico-chimique des produits*

Sur tous les produits des essais technologiques, la sensibilité de l'amidon à l'alpha-amylase bactérienne et sa fraction facilement attaquable F ont été déterminées selon la méthode décrite par DELORT-LAVAL et MERCIER (1976). Pour déterminer la solubilité en milieu salin de l'urée des produits d'extrusion, intacts ou

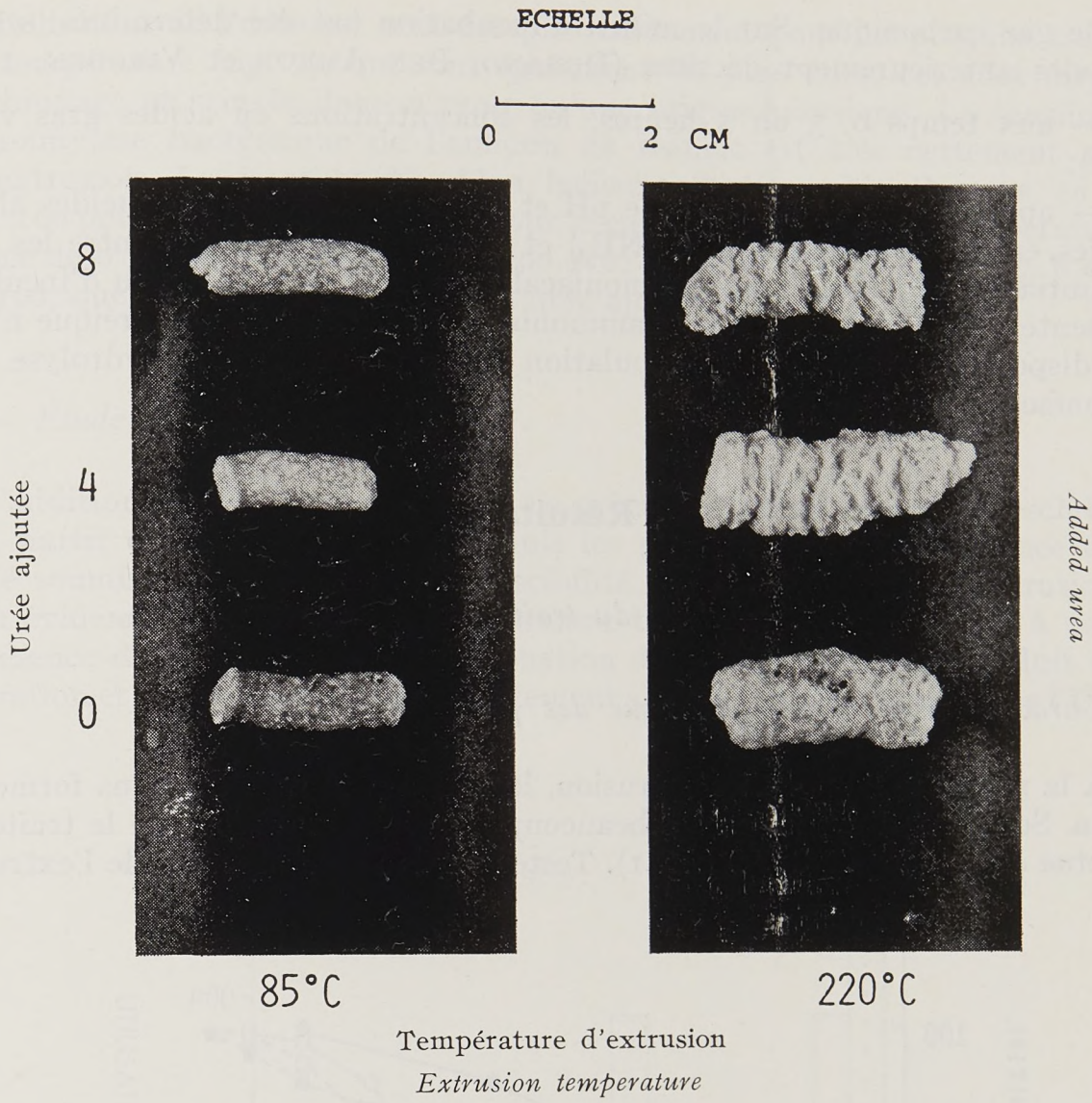



FIG. 1. — Taille et forme du manioc extrudé à deux températures et à divers taux d'urée.
*Size and shape of cassava extruded at two temperatures with various urea levels.*

broyés, une prise d'essai contenant 400 mg d'urée a été introduite dans 100 ml de NaCl 0,15 M et placée au bain-marie à 38 °C avec agitation continue. Dans le filtrat de cette incubation, la quantité d'urée solubilisée a été déterminée à différents intervalles de temps pendant 5 heures.

### 3. — *Incubation des produits en milieu de rumen* in vitro

L'utilisation de l'urée par la microflore du rumen a été estimée *in vitro* selon une méthode adaptée de celle de SCHWARTZ, SCHOEMAN et FARBER (1964). Le substrat comprenait 8 g de produit à tester, préalablement broyé, 0,32 ou 0,64 g d'urée selon les essais et 4 g de paille broyée; il était mélangé à 200 ml de salive artificielle (TISSERAND et ZELTER, 1965) et à un égal volume de contenu total de rumen non filtré. Ce dernier était prélevé avant le repas du matin sur des moutons adaptés à un régime concentré contenant 1,8 p. 100 d'urée mais quasiment dépourvu par ailleurs de protéines solubles. Les flacons d'incubation (2 par traitement) ont été placés au bain-marie à 39 °C et maintenus en anaérobiose par barbotage

lent de gaz carbonique. Sur le milieu d'incubation ont été déterminés, selon les méthodes antérieurement décrites (DURAND, BEN AMEUR et VIROBEN, 1974) :

— aux temps 0, 3 ou 5 heures, les concentrations en acides gras volatils (AGV);

— après 0, 1, 3 ou 5 heures, le pH et les concentrations en glucides alcoolo-solubles, en azote ammoniacal ($N\text{-}NH_3$) et en urée. La différence entre les quantités initiales et finales d'azote ammoniacal et uréique dans le milieu d'incubation représente « l'utilisation de l'azote ammoniacal » (U.A.A.); l'azote uréique n'est en effet disponible pour la micropopulation du rumen qu'après hydrolyse en N ammoniacal.

## Résultats

### 1. — *Effet du traitement d'extrusion*

#### 1.1. *Caractérisation physico-chimique des produits*

A la sortie de l'appareil d'extrusion, le mélange se présente sous forme d'un boudin. Son taux d'expansion est beaucoup plus important lorsque le traitement s'effectue à 220 °C qu'à 85 °C (fig. 1). Testée sur le boudin sortant de l'extrudeur,

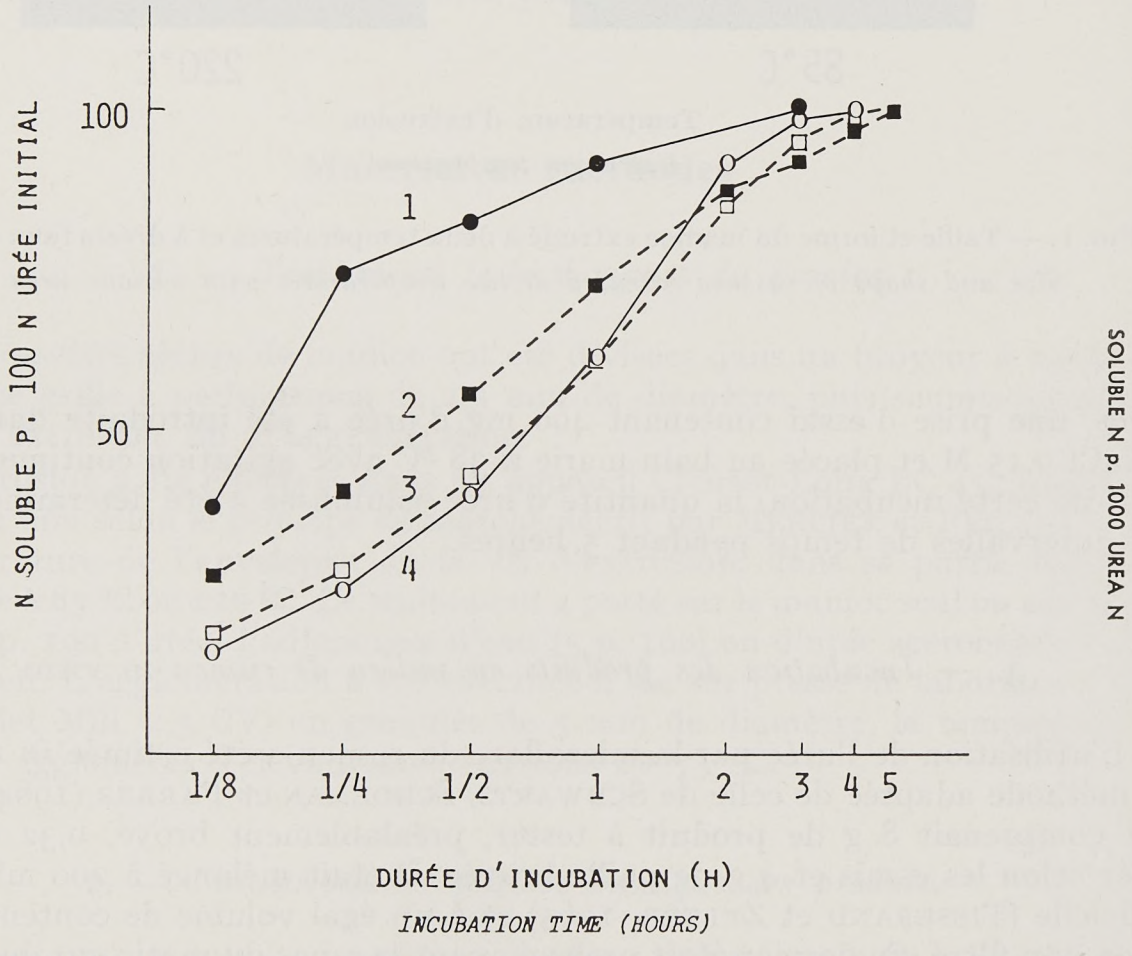



FIG. 2. — Solubilisation en fonction du temps de N-uréique de mélanges manioc-urée extrudés à 85 °C ou 220 °C, puis broyés et agglomérés — (1) 220 °C, 4 p. 100 urée; (2) 220 °C, 8 p. 100 urée; (3) 85 °C, 8 p. 100 d'urée; (4) 220 °C, 4 p. 100 d'urée.

*Urea-N solubility of cassava-urea mixtures, extruded at 85 or 220 °C, then ground and pelleted.*

la solubilisation de l'urée est retardée plus nettement pour les produits traités à basse température (fig. 2), qui sont également les plus durs; cet effet disparaît après broyage et semble donc n'avoir qu'une origine physique. La sensibilité à l'alpha-amylase bactérienne de l'amidon de manioc est très nettement accrue par l'extrusion. La fraction d'amidon facilement attaquable F passe en effet de 4 p. 100 pour le témoin à 52 p. 100 pour le mélange traité à basse température en présence de 8 p. 100 d'urée et à 73 p. 100 avec 4 p. 100 d'urée. A 220 °C, F est de 70 p. 100, quelle que soit la quantité d'urée ajoutée (4 ou 8 p. 100).

1.2. — *Étude de fermentescibilité*

L'addition d'urée avant extrusion ne procurant aucun retard à sa solubilisation à partir d'échantillons broyés, seuls les produits traités en absence d'urée ont été soumis aux tests de fermentescibilité *in vitro*. L'effet de l'extrusion est mis en évidence par comparaison du manioc témoin au produit traité à 220 °C. En présence de 8 p. 100 d'urée, l'incubation de l'amidon extrudé conduit à une accélération et à une augmentation hautement significatives ($P < 0{,}01$) de l'U.A.A.

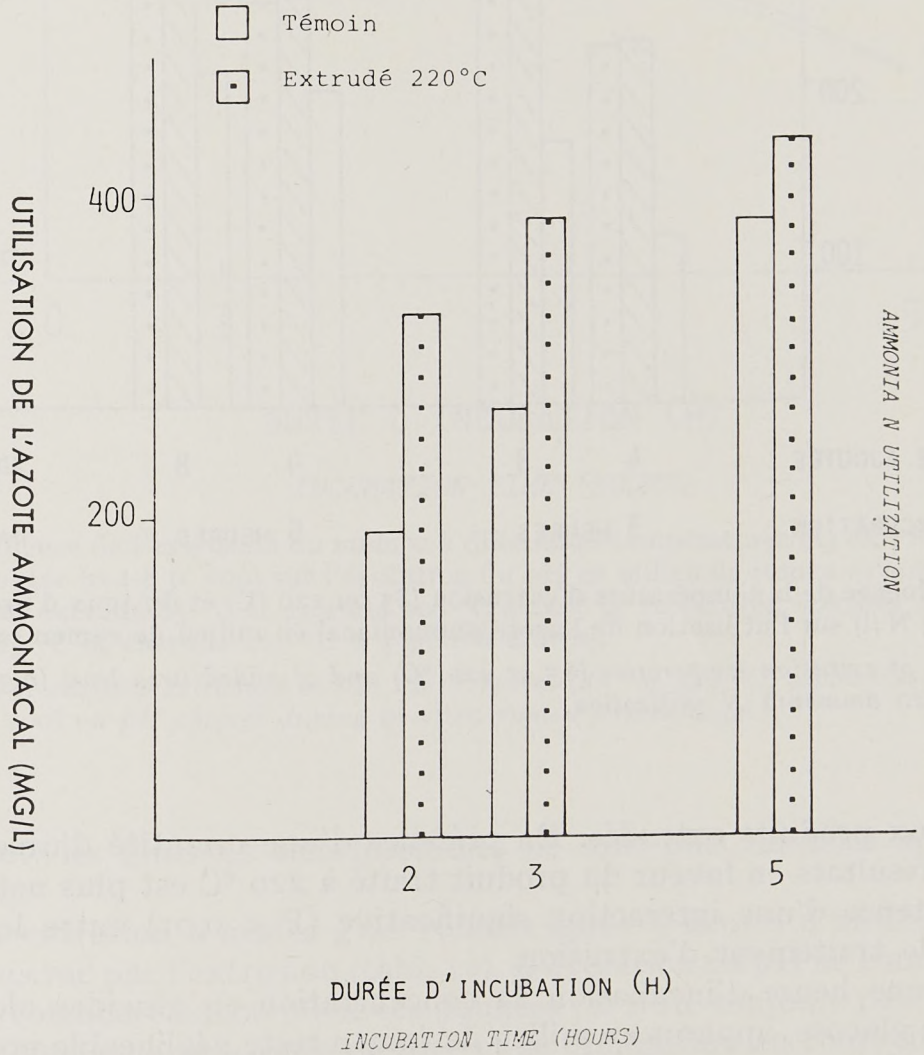



FIG. 3. — Influence de l'extrusion du manioc à 220 °C sur l'utilisation de l'azote ammoniacal (concentration initiale N urée + N — $NH_3$ : 0,820 g/l) en milieu de rumen *in vitro*.

In vitro *ammonia N utilization in presence of control or 220 °C-extruded cassava (initial urea concentration : 0,820 g/l)*.

(fig. 3) : alors qu'avec le témoin, la consommation d'urée atteint en cinq heures 50 p. 100 de celle introduite, le même résultat est obtenu en trois heures avec l'aliment traité. Dans un deuxième essai, le manioc extrudé à deux températures a été comparé au témoin non traité en présence de 4 ou 8 p. 100 d'urée. Les effets de la durée d'incubation, du taux d'urée ajoutée et du traitement, testés par analyse de variance, sont tous hautement significatifs ($P < 0{,}01$) ($s_e$ : 13,4; $n = 32$; p.p.d.s. $_{0.05} = 29$ mg). L'U.A.A. est, en valeur absolue, toujours plus élevée dans le milieu le plus riche en urée (fig. 4). Par contre, le rendement de conversion de l'urée, par rapport à celle introduite, est plus faible lorsque son taux d'incorporation passe de 4 à 8 p. 100. Au taux azoté le plus faible, l'U.A.A. est identique

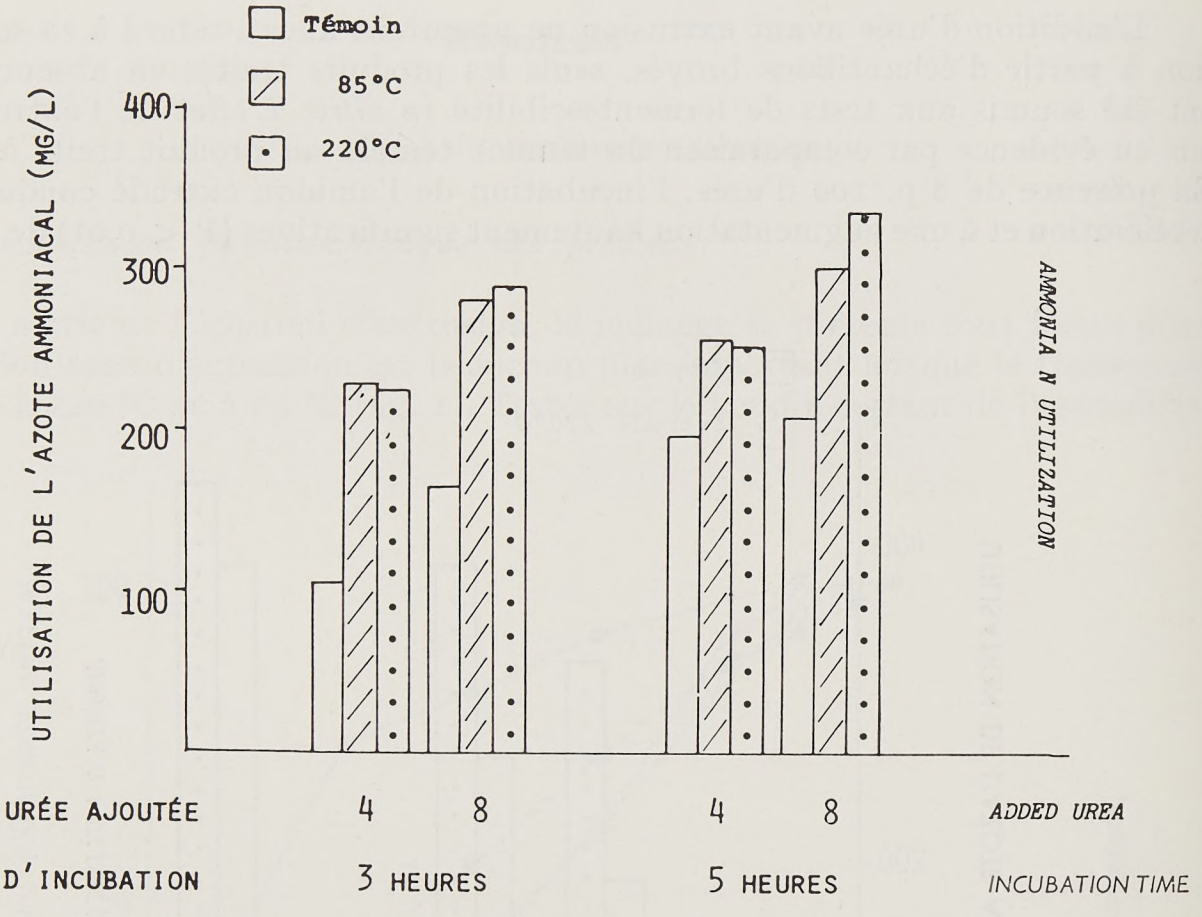



FIG. 4. — Influence de la température d'extrusion (85 ou 220 °C) et du taux d'urée ajoutée (0,37 ou 0,74 g N /l) sur l'utilisation de l'azote ammoniacal en milieu de rumen *in vitro*.

*Influence of extrusion temperature (85 or 220 °C) and of added urea level (0,37 or 0,74 Ng /l) on* in vitro *ammonia N utilization.*

pour les deux produits extrudés. En présence d'une quantité d'urée plus élevée, l'écart des résultats en faveur du produit traité à 220 °C est plus net, ce que confirme l'existence d'une interaction significative ($P < 0{,}01$) entre le taux d'urée ajoutée et le traitement d'extrusion.

Après une heure d'incubation, la concentration en glucides alcoolosolubles, exprimés en glucose, apparus en milieu de rumen reste négligeable pour le témoin; avec les produits traités, elle est d'autant plus importante que le taux d'urée ajoutée est plus bas et la température d'extrusion plus élevée (tabl. 1*a*). Après 3 heures d'incubation, seul le traitement le plus intense (220 °C, 4 p. 100 d'urée) maintient une concentration significative de glucides (0,12 g /l). Enfin, quel que soit

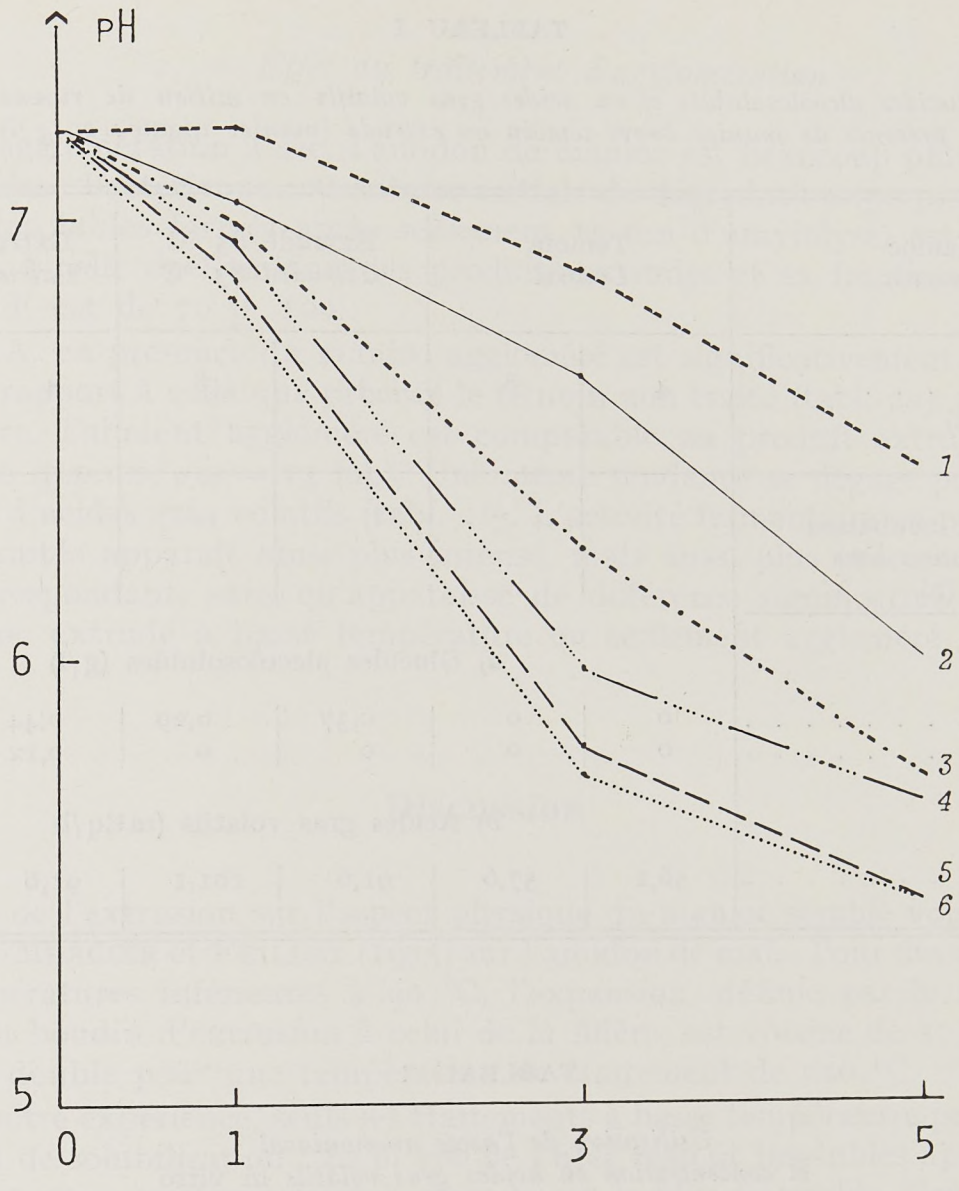



FIG. 5. — Influence de l'extrusion du manioc à différentes températures (85 ou 220 °C) et du taux d'urée ajoutée (0-4-8 p. 100) sur l'évolution du pH en milieu de rumen *in vitro* (courbes 1, 3, 4 : témoin, extrudé 85 °C et extrudé 220 °C avec 8 p. 100 d'urée; courbes 2, 5, 6 : témoin, extrudé 85 °C et extrudé 220 °C à 4 p. 100 d'urée).

*Influence of cassava extrusion at two temperatures (85° or 220 °C) and of level of added urea (0-4-8 p. 100) on pH change during* in vitro *rumen fermentation.*

le traitement, les glucides alcoolosolubles ne sont plus dosables après 5 heures d'incubation.

La concentration d'acides gras volatils après 3 heures d'incubation est très nettement accrue par l'extrusion (tabl. 1*b*). L'évolution du pH au cours de l'incubation (fig. 5) corrobore exactement ces données : il reste toujours plus élevé dans le milieu initialement le plus riche en urée et sa diminution au cours de l'incubation est légèrement accentuée en présence du produit traité à la température la plus élevée. Les différences observées entre les deux aliments traités sont cependant peu sensibles à la fin de l'incubation.

TABLEAU I

*Teneur en glucides alcoolosolubles et en acides gras volatils en milieu de rumen* in vitro *en présence de manioc broyé témoin ou extrudé (manioc ajouté : 20 g /l)*

| Manioc *Cassava* | Témoin *Control* | | Extrudé 85 °C *Extruded 85 °C* | | Extrudé 220 °C *Extruded 220 °C* | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Urée . . . . . *Urea* (p. cent) | 4 | 8 | 4 | 8 | 4 | 8 |
| Durée d'incubation *Incubation time* (h) | | | | | | |
| | *a*) Glucides alcoolosolubles (g /l) | | | | | |
| 1. . . . . | 0 | 0 | 0,37 | 0,29 | 0,44 | 0,32 |
| 3. . . . . | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,12 | 0 |
| | *b*) Acides gras volatils (mEq /l) | | | | | |
| 3. . . . . | 56,1 | 57,6 | 91,6 | 101,1 | 91,6 | 108,6 |

TABLEAU 2

*Utilisation de l'azote ammoniacal et concentration en acides gras volatils* in vitro *en présence de manioc broyé témoin, aggloméré ou extrudé (concentration initiale d'N-urée : 0,4 g /l)*

| Durée d'incubation *Incubation time* (h) | Manioc *Cassava* | | |
|---|---|---|---|
| | Témoin *Control* | Extrudé 85 °C *Extruded 85 °C* | Aggloméré et rebroyé *Pelleted and reground* |
| | *a*) Utilisation de l'azote ammoniacal (mg /l) | | |
| 2. . . . . | 60 | 200 | 180 |
| 3. . . . . | 160 | 250 | 260 |
| 5. . . . . | 210 | 290 | 300 |
| | *b*) Acides gras volatils (mEq /l) | | |
| 3. . . . . | 65,3 | 89,8 | 82,8 |
| 5. . . . . | 93,0 | 110,8 | 106,0 |

2. — *Effet du traitement d'agglomération*

Après agglomération à sec, l'amidon de manioc est beaucoup plus sensible à l'alpha-amylase bactérienne : sa vitesse initiale de dégradation (50 p. 100 de glucides alcoolosolubles formés après seulement 15 mn d'amylolyse) est tout à fait comparable à celle de l'amidon des produits extrudés et sa fraction facilement attaquable F est de 70 p. 100.

L'U.A.A. en présence du manioc aggloméré est significativement ($P < 0,01$) accrue par rapport à celle que procure le témoin non traité (tabl. 2*a*). Sur la base de ce critère, l'aliment aggloméré est comparable au produit extrudé à basse température (p.p.d.s. $_{0.05} = 13$ mg). Une même tendance se dégage pour les concentrations d'acides gras volatils (tabl. 2*b*). L'activité fermentaire en présence des substrats traités apparaît ainsi plus intense, mais aussi plus précoce qu'avec le témoin correspondant, sans qu'apparaisse de différence significative d'efficacité entre manioc extrudé à basse température ou seulement aggloméré.

## Discussion

L'effet de l'extrusion sur l'aspect physique du manioc semble voisin de celui observé par Mercier et Feillet (1975) sur l'amidon de maïs. Pour des traitements à des températures inférieures à 90 °C, l'expansion, définie par le rapport du diamètre du boudin d'extrusion à celui de la filière, est voisine de 2; elle atteint une valeur double pour une température de traitement de 220 °C.

Dans notre expérience, seuls les traitements à basse température procurent un léger retard de solubilisation : 40 p. 100 de l'urée restent insolubles après 1 heure et seulement 15 p. 100 en 2 heures, dans le cas le plus favorable. Cet effet est à mettre en relation avec la dureté élevée du produit extrudé à basse température. Il disparaît en effet après broyage; l'extrusion n'a donc pas provoqué la création du complexe chimique stable suggéré par Shultz, Shultz et Chicco (1972), à partir de leurs observations sur le retard de solubilisation de l'urée au niveau du rumen, lorsque celle-ci est incorporée au produit amylacé avant traitement à température élevée et sous pression. En revanche, il est possible qu'une modification physique de l'urée par le traitement (passage de la structure cristalline à la structure amorphe, Behnke *et al.*, 1973) ne se traduise pas par une baisse de solubilité de l'urée dans un produit broyé après extrusion. Sur le plan technologique, l'incorporation d'urée avant extrusion a provoqué une accélération de la vitesse de passage dans l'extrudeur : ce phénomène, associé à une température basse d'extrusion (85 °C), pourrait expliquer le moindre accroissement de la fraction d'amidon facilement attaquable du produit traité en présence de 8 p. 100 d'urée. L'addition de cette substance avant extrusion n'a donc pas un effet favorable sur la disponibilité de l'amidon du manioc traité.

En l'absence d'urée, contrairement à ce qui est observé sur l'amidon de maïs (Mercier et Feillet, 1975), on obtient, dès la température de 85 °C, le degré maximal de sensibilité à l'amylase de l'amidon de manioc; après agglomération, la fraction d'amidon facilement attaquable est comparable à celle observée après extrusion. Ainsi, le manioc apparaît comme très sensible aux traitements par la chaleur; son comportement s'apparente, à cet égard, à celui du blé ou de l'orge

(DELORT-LAVAL et MERCIER, 1976). Dans un travail antérieur, MELCION *et al.* (1974) avaient d'ailleurs déjà noté la sensibilité accrue à l'alpha-amylase de l'amidon d'un aliment de sevrage du porcelet, riche en manioc, après pressage à sec.

En raison des variations d'activité des contenus de rumen, les résultats des essais *in vitro* peuvent différer d'une incubation à l'autre pour un même produit. Cependant, les écarts mis en évidence entre produits se répètent et sont toujours dans le même sens au cours d'essais successifs. Tous les traitements d'extrusion appliqués, dans le présent essai, au manioc, qui accroissent très fortement le taux de son amidon facilement attaquable, augmentent la production de glucides alcoolosolubles en milieu de rumen *in vitro*. L'utilisation d'azote ammoniacal par les microorganismes et la production d'acides gras volatils s'en trouvent accrues; il en résulte une diminution nettement plus rapide du pH, facteur susceptible de réduire *in vivo* non seulement l'absorption d'ammoniac au niveau du rumen, mais également la protéosynthèse bactérienne.

L'effet favorable d'une élévation de la température d'extrusion ne se manifeste pas lorsque le taux d'urée reste limité à 4 p. 100. Il est, par contre, un peu plus marqué en présence d'une concentration plus élevée d'azote non protéique. Toutefois, les différences observées n'ont pas l'ampleur de celles relevées par STILES *et al.* (1970) dans le traitement du sorgho soumis à l'extrusion en présence de 5 p. 100 d'urée.

Comparée à l'extrusion à basse température, l'agglomération à sec du manioc modifie de manière très similaire ses caractéristiques physico-chimiques et sa fermestescibilité. L'amélioration de l'utilisation de l'azote ammoniacal, sous l'influence de ce dernier traitement, est tout à fait comparable à celle observée, au taux de 3,25 p. 100 d'urée, après agglomération à la vapeur (+ 40 p. 100 en 5 h) dans une autre étude (SZYLIT *et al.*, 1978). Il semble donc qu'à des taux d'urée ne dépassant pas 4 p. 100, il soit inutile d'appliquer au manioc un traitement thermique intense et donc coûteux. De ce fait, cet amylacé apparaît, après agglomération à une température suffisamment élevée, comme une source glucidique, complémentaire de l'urée, particulièrement intéressante pour l'alimentation du ruminant, ce que les essais sur animaux, actuellement en cours, tentent de vérifier.

*Reçu pour publication en mai 1978.*

## Remerciements

A J. P. TISSIER et F. DE MONREDON pour la réalisation des essais d'extrusion et à C. MERCIER-GREENWOOD pour l'évaluation enzymatique de l'endommagement de l'amidon.

## Summary

*Effect of extrusion and pelleting on cassava starch degradability and* in vitro *urea utilization by rumen microorganisms*

The starch of sun-dried and ground cassava (*Manihot utilissima* Pohl) roots is degraded by a bacterial alpha-amylase to a limited extent. Extrusion, even at a low temperature in a double-screw extruder heated by induction, or dry pelleting strongly increase starch susceptibility to

enzymatic degradation —from 4 to about 70 p. 100. When cassava and urea are extruded together, no delay is observed in urea solubilization of reground urea-cassava starch mixtures.

At 4 or 8 p. 100 urea levels, extrusion or pelleting of cassava improves to the same extent the ammonia-N utilization from urea by rumen microorganisms *in vitro*.

Cassava pelleting thus appears as an inexpensive and efficient mean to improve the carbohydrate availability and NPN utilization by rumen microorganisms.

Key words: *cassava, heat treatment, urea utilization, ruminant.*

## Références bibliographiques

BEHNKE K. C., DEYOE C. W., BARTLEY E. E., GRIFFEL G. W., 1973. Results from examining urea-containing protein supplement by scanning electron microscopy. Feedstuffs, **45** (46), 25, 28-29.

BORGIDA L. P., DURAND M., DELORT-LAVAL J., 1976. Évaluation de divers traitements technologiques des céréales. VIII. — Efficacité comparée de traitements thermiques du maïs pour l'utilisation de l'urée *in vitro* chez le chevreau précocement sevré. *Ann. Zootech.*, **25**, 71-77.

DELORT-LAVAL J., MERCIER C., 1976. Évaluation de divers traitements technologiques des céréales. I. — Choix des traitements et étude de leur influence sur la fraction glucidique du blé, de l'orge et du maïs. *Ann. Zootech.*, **25**, 3-12.

DURAND M., BEN AMEUR M., VIROBEN G., 1974. Influence d'un traitement hydrothermique de l'orge sur la digestion des matières azotées dans le rumen du mouton : études au niveau du rumen et de l'abomasum. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **14**, 167-192.

MELCION J. P., VAISSADE P., VALDEBOUZE P., VIROBEN G., 1974. Influence des conditions d'agglomération sur quelques caractéristiques physicochimiques d'un aliment pour porcelet. *Ann. Zootech.*, **23**, 149-160.

MERCIER C., FEILLET P., 1975. Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products. *Cereal Chem.*, **52**, 283-297.

MUHRER M. E., HARRIS D. W., BLOMFIELD R. A., 1968. A reacted NPN-carbohydrate complex from urea. *J. Anim. Sci.*, **27**, 1770 (Abstract).

SCHWARTZ H. M., SCHOEMAN C. A., FARBER M. S., 1964. Utilization of urea by sheep. I — Rates of breakdown of urea and carbohydrate *in vivo* and *in vitro*. *J. Agric. Sci.*, **63**, 289-296.

SHULTZ T. A., SHULTZ E., CHICCO C. F., 1972. Pressure cooked urea cassava meal for lambs consuming low quality hay. *J. Anim. Sci.*, **35**, 865-870.

SHULTZ T. A., CHICCO C. F., SHULTZ E., CARNEVALI A. A., 1970. — Evaluación de differentes fuentes de energia (yuca, maïz, arroz y melaza) sobre la utilisación de altos niveles de urea en bovines. *Agronomia tropical*, **20**, 185-194.

STILES D. A., BARTLEY E. E., MEYER R. M., DEYOE C. W., PFOST H. P., 1970. Feed processing. VII. — Effect of an expansion-processed mixture of grain and urea (Starea) on rumen metabolism in cattle and on urea toxicity. *J. Dairy Sci.*, **53**, 1436-1447.

SZYLIT O., DURAND M., BORGIDA L. P., ATINKPAHOUN H., PRIETO F., DELORT-LAVAL J., 1978. Raw and steam pelleted cassava, sweet potato and Yam *cayenensis* as starch sources for ruminant and chicken diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **3**, 73-87.

TISSERAND J. L., ZELTER S. Z., 1965. Essai de normalisation d'une technique de mesure de la digestion des fourrages *in vitro* « rumen artificiel ». *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **5**, 101-111.

# RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

*Au début de chaque mémoire*, on indiquera — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes); — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de...; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

*Les mémoires* seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible; e) *discussion et conclusion*; f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduits en anglais comportant une analyse *complète* de l'article; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques*.

*Les travaux originaux en anglais* doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet*. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

*Pour les autres documents* (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

*Les références bibliographiques* doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

*Pour les articles :* le(s) nom(s) de(s) auteur(s) suivis des initiales du (des) prénom(s); la date de parution de l'article; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées); le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.;* le volume, la première et la dernière page de l'article.

*Pour les ouvrages :* le nom de l'auteur avec les initiales du prénom; la date de l'édition; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine); le volume; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs; le nom de l'éditeur; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc., doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

*Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part.* Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

*Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils* seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

*Photographies :* Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos : 9 × 12; 4 photos : 9 × 5,5; 6 photos : 5,5 × 5,5. Dans ce cas chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

*Envoi du manuscrit :* M. Bourdet, Laboratoire de Technologie des Blés, 16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris, ou M. Dupuy, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, Centre de Recherches de Dijon, 21034 Dijon Cedex. On demande deux exemplaires.

*Correction des épreuves :* les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à M. Bourdet.

Technologie Agricole.

CPPAP n° 1433 *Le Directeur de la publication :* M.-L. Cagnac

# annales de technologie agricole

Trimestriel

1979

Vol. 28 - N° 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (3), 255-272.

# Étude de la lipolyse chez quelques levures isolées de denrées alimentaires variées

R. ALIFAX
*Laboratoire des Industries Agricoles et Alimentaires*
*Institut National Agronomique Paris-Grignon*
*16, rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05*

## Résumé

L'aptitude des levures à la lipolyse a été jusqu'alors peu étudiée. Seules les espèces *Candida lipolytica* et *Candida paralipolytica* ont retenu l'attention des chercheurs. Les levures étant très répandues, notamment dans les aliments, nous avons recherché si d'autres espèces présentent la même aptitude.

A partir de produits alimentaires variés, 372 souches ont été isolées et testées.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence la présence des enzymes lipolytiques estérases (E.C. 3.1.1.1.) et glycérol ester hydrolases (E.C. 3.1.1.3.) en utilisant comme substrat le Tween 80, la tributyrine et des triglycérides mixtes d'origine animale et végétale.

Dans un second temps, nous avons étudié la libération des acides gras des triglycérides de l'huile de beurre par les glycérol ester hydrolases de quatre souches de levures, *(Candida curvata, Candida lipolytica, Cryptococcus laurentii, Trichosporon cutaneum)* choisies parmi les précédentes, parce que fréquemment rencontrées.

Les acides gras ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse. Une colonne capillaire a été utilisée.

Les acides gras à 4 et 6 atomes de carbone ne sont pas dosés. En revanche, on observe une bonne séparation des acides comptant 8 à 20 atomes de carbone.

L'identification des acides gras libérés a montré que les lipases produites par toutes les souches étudiées présentent une spécificité d'action pour les acides caprylique, caprique et laurique. *Candida lipolytica* a montré également une spécificité pour l'acide oléique et *Trichosporon cutaneum* pour l'acide myristique.

Mots Clés : *levures, lipolyse, enzymes, estérases, glycérol ester hydrolases, acides gras.*

## Introduction

Les propriétés biochimiques des levures ont fait l'objet de nombreux travaux. Toutefois, l'aptitude à la lipolyse figure parmi les propriétés les moins étudiées. Or, les levures sont très répandues dans la nature. Leur dissémination est assurée facilement par l'air, l'eau et le sol qui constituent leur habitat naturel. Elles peuvent donc contaminer les produits alimentaires et, lorsque ceux-ci contiennent des lipides, provoquer des altérations résultant de leurs propriétés lipolytiques.

Plusieurs espèces de levures lipolytiques ont été isolées de la viande congelée. ABOUKHEIR et KILBERTUS (1974) déterminent 16 souches appartenant aux genres *Candida, Debaryomyces, Rhodotorula, Torulopsis* et *Trichosporon*. Ces germes se multiplient à la surface de la viande en formant un film visqueux responsable de la lipolyse de la fraction adipeuse des tissus.

MOUREY *et al.* (1977) étudient le pouvoir lipolytique des levures isolées de produits carnés. L'abaissement du pH de la viande, lors de sa maturation, favorise leur développement (INGRAM, 1958).

L'intervention fréquente des levures dans le rancissement du beurre a été également signalée. SJOSTRÖM (1959), GARRISON et HOLDER MARY (1963) isolent du beurre et de la crème 291 souches de levures, parmi lesquelles plusieurs sont lipolytiques. Ces dernières appartiennent aux genres *Candida, Cryptococcus, Trichosporon* et *Rhodotorula*.

La plupart des travaux sur l'activité lipolytique des levures insistent sur les propriétés de *Candida lipolytica* et *C. paralipolytica* qui produisent des enzymes appartenant aux deux grands types : estérases et lipases.

OTA et YAMADA (1966, 1967) étudient la lipase de *Candida paralipolytica* et les effecteurs de cette enzyme.

CASTAGNON-VELEZ et INIGO LEAL (1973) mettent en évidence le rôle de *Candida lipolytica* dans l'altération de la margarine.

PROKS *et al.* (1959) montrent que la présence de cette levure dans les fromages « bleus » renforce leurs qualités organoleptiques. On sait que les produits de la lipolyse de la matière grasse du lait jouent un rôle important dans le développement de la saveur caractéristique des fromages de ce type. L'addition au lait de la lipase produite par une souche de *Candida lipolytica* a été envisagée en vue d'améliorer la qualité des fromages à pâte persillée (PETERS et NELSON, 1961).

On peut enfin rappeler que la croissance des levures appartenant au genre *Pityrosporum* requiert un apport de matière grasse ou d'acides gras (OTA et HUANG, 1933; BENHAM, 1941; SHIFRINE et MARR, 1963; RANDJANDICHE, 1976).

Le but de notre étude, dans une première partie, est de préciser la fréquence de l'aptitude à la lipolyse observée chez les levures présentes dans des denrées alimentaires variées et de caractériser les types d'enzymes lipolytiques en cause. Dans une seconde partie est étudiée la libération des acides gras par les glycérol ester hydrolases de quelques souches de levures choisies parmi celles qui sont rencontrées le plus fréquemment.

## Matériel et méthodes

### I. — *Isolement des levures lipolytiques et caractérisation de leur activité enzymatique*

#### 1.1. *Origine des levures étudiées*

Les levures étudiées sont isolées d'aliments variés (lait, crème, beurre, fromage, charcuterie, plat cuisiné, pâtisserie) prélevés dans des restaurants de collectivité.

#### 1.2. *Isolement des levures*

Le peuplement généralement faible des aliments étudiés impose un enrichissement préalable.

##### 1.21. *Milieu d'enrichissement*

L'enrichissement en levures est réalisé à l'aide d'un milieu glucosé utilisé à simple concentration ($n$) et à double concentration ($2n$), additionné d'oxytétracyline (milieu OGA).

La composition du milieu à simple concentration est la suivante : glucose 20 g, extrait de levures 5 g, eau q.s.p. 1 000, pH 6,8-7,0. En vue de son utilisation à l'état solide, le milieu est gélosé à 20 p. 1 000.

A l'état liquide, le milieu à simple concentration est réparti en tubes à essais à raison de 9 ml par tube alors que le milieu à double concentration est réparti à à raison de 5 ml par tube.

Au moment de l'emploi on ajoute un volume d'une solution d'oxytétracycline à 0,1 p. 100, de manière à obtenir une concentration de 100 ng d'antibiotique par millilitre de milieu.

La solution d'antibiotique est au préalable stérilisée par filtration sur filtre Zeitz.

##### 1.22. *Mode opératoire*

A 5 ml de milieu liquide à double concentration, sont ajoutés 5 ml d'une suspension en tryptone-sel, d'un broyat de l'aliment à examiner. Ce broyat est obtenu à l'aide d'un mixeur-agitateur « Ultra Turrax », dont le rotor tourne à 20 000 tours/minute. L'appareil comprenant stator et rotor est stérilisé au préalable à l'autoclave.

Le mélange est porté à l'étuve à 25 °C, pendant 48 heures, puis 5 ml du mélange sont introduits dans un second tube de milieu liquide à double concentration. Ce tube est maintenu à 25 °C pendant 48 heures.

A l'issue de ce délai, 1 ml de la culture est ajouté à 9 ml de milieu liquide à simple concentration. Une incubation à 25 °C pendant 24 heures est réalisée puis la culture est centrifugée.

Une anse du culot de centrifugation est disséminée en stries latérales sur le milieu OGA gélosé coulé en boîtes de Pétri. Après 48 heures, les colonies de levures sont repérées et prélevées.

### 1.3. *Mise en évidence des levures lipolytiques*

#### 1.31. *Milieux de culture*

Un milieu de base unique a été retenu. C'est le milieu décrit par AUDREY JONES RICHARDS (1952) dont la formule est la suivante : peptone pancréatique 10 g, extrait de levure 3 g, chlorure de sodium 5 g, gélose 20 g, eau q.s.p. 1 000, pH 7,8-8,0. Ce milieu est fondu, filtré sur laine de verre, puis divisé en deux fractions.

— l'une est répartie en l'état dans les fioles de 250 ml à raison de 190 ml par fiole. C'est le milieu F1,

— l'autre est additionnée d'une solution de Bleu Victoria au 1/150, à raison de 10 ml par litre de milieu. Ainsi coloré le milieu est réparti en fioles dans les mêmes conditions que la fraction précédente. C'est le milieu F2.

Les milieux F1 et F2 sont stérilisés à 120 °C pendant 20 minutes.

#### 1.32. *Mise en évidence des levures produisant des estérases (E.C. 3.1.1.1.)*

Ces enzymes hydrolysent les esters d'acides gras solubles dans l'eau. Le substrat utilisé est le Tween 80 (monoléate de sorbitol) préconisé par SIERRA (1957).

Au milieu F1 fondu, dont la température est ramenée à 45-50 °C, on ajoute 9 ml d'une solution de Tween 80 à 5 p. 100, puis 1 ml d'une solution de chlorure de calcium à 1 p. 100. Ces deux solutions sont au préalable stérilisées à 120 °C pendant 20 minutes.

Les levures possédant une estérase développent sur ce milieu, autour de leurs colonies, une opacification consécutive à la formation d'oléate de calcium.

#### 1.33. *Mise en évidence des levures produisant des lipases E.C. 3.1.1.3.*

La mise en œuvre de la tributyrine pour la recherche des microorganismes lipolytiques, notamment dans les produits laitiers, a été proposée en 1940, par la British Standard Spécification n° 895. Depuis, cette méthode a fait l'objet de nombreuses observations.

Ainsi AUDREY JONES et RICHARDS (1952), BRANDL *et al.* (1962), HUGO et BEVERIDGE (1962), ALFORD et STEINLE (1966) constatent que certains microorganismes produisant une zone claire sur le milieu à la tributyrine hydrolysent faiblement les triglycérides de l'huile de beurre. Leurs enzymes peuvent donc être sans action sur des triglycérides plus complexes.

RATH (1961) critique également l'emploi de ce triglycéride synthétique comme substrat. L'auteur estime que les produits alcalins formés lors de la croissance de certains germes peuvent donner lieu, sur ce milieu, à des réactions faussement positives.

Pour ces auteurs le test de la tributyrine doit être considéré comme présomptif et les propriétés lipolytiques vraies d'un microorganisme doivent être confirmées

sur un milieu gélosé renfermant un triglycéride plus complexes, d'origine animale ou végétale.

En tenant compte de ces observations, nous avons distingué, parmi les souches isolées, celles dont l'action des enzymes lipolytiques est limitée à l'hydrolyse de la tributyrine (tributyrinase), de celles dont les enzymes hydrolysent les triglycérides plus complexes (lipases vraies).

Les subtrats sont constitués par des émulsions de triglycérides divers, dans une solution de Tween 20 à 1 p. 100 (ALIFAX, 1958). Ces émulsions sont préparées dans un mixer à usage domestique (Turmix).

Les triglycérides mis en œuvre sont synthétiques (tributyrine) ou d'origine naturelle, animale ou végétale (huiles de beurre et de margarine, huiles d'arachide, de colza, d'olive, de palme, de soja et de tournesol).

Les différentes émulsions sont réparties en tubes à essais à raison de 10 ml par tube et stérilisées à 118 °C durant 20 minutes.

A une fiole contenant le milieu F2 fondu et ramené à 45-50 °C, on ajoute le contenu d'un tube de l'émulsion du triglycéride sur lequel on désire étudier l'action des lipases. Après mélange, le milieu est coulé en boîtes de Pétri. Sa coloration initiale est brun-chocolat.

Sur le milieu dont le substrat est la tributyrine, les levures possédant une tributyrinase développent autour de leurs colonies une plage de lyse colorée en bleu.

Sur le milieu dont le substrat est un triglycéride complexe, les levures possédant une lipase développent autour de leurs colonies une coloration bleue.

### 1.4. *Isolement des levures lipolytiques*

Les colonies de levures repérées sur les boîtes de milieu OGA, sont repiquées ponctuellement, sur les trois types de milieux précédemment décrits. Ces milieux sont incubés à 25 °C pendant 48 heures puis les boîtes sont examinées. 372 souches de levures ont été ainsi testées.

La figure 1 schématise les différentes étapes du protocole expérimental.

## II. — *Étude comparée de l'hydrolyse des triglycérides de l'huile de beurre par diverses souches de levures*

Dans le prolongement de l'étude précédente, il a été entrepris de préciser la nature des acides gras libérés par quelques-unes des levures isolées.

Le substrat mis en œuvre est constitué par les triglycérides de l'huile de beurre.

### 2.1. *Culture des souches*

A 190 ml du milieu d'AUDREY JONES et RICHARDS, on incorpore 10 ml d'une émulsion d'huile de beurre à 50 p. 100 dans une solution de Tween 20 à 1 p. 100.

Le mélange est ensuite réparti dans 5 boîtes de Pétri de 220 mm de diamètre.

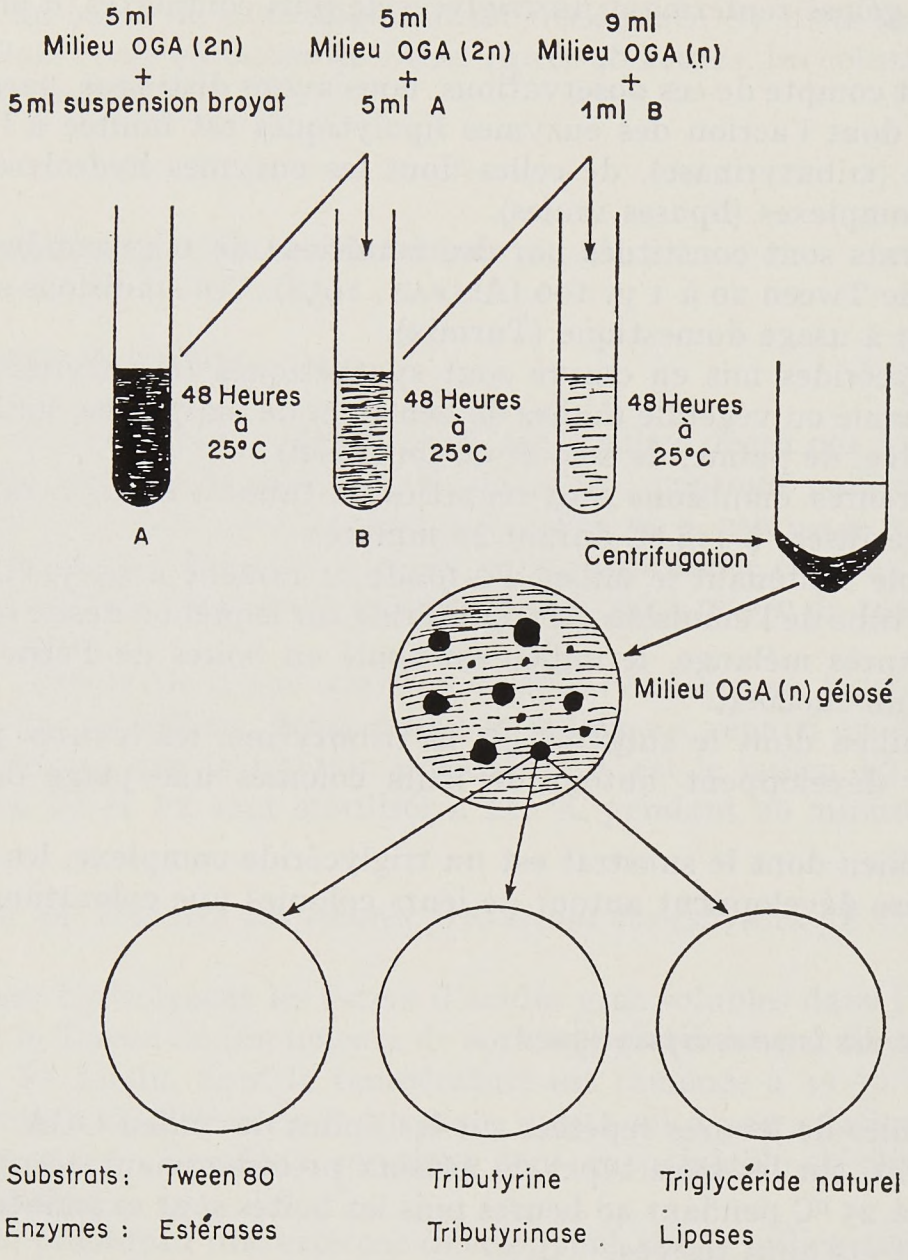



FIG. 1. — *Schéma du protocole expérimental.*

Après solidification, les boîtes sont inondées à l'aide d'une suspension en tryptone-sel de la souche de levure à étudier. L'excès du liquide d'ensemencement est prélevé par succion en s'aidant de la trompe à vide. Chaque souche étudiée donne lieu à l'ensemencement de 5 boîtes qui sont maintenues à 25 °C.

### 2.2. *Récolte des milieux de culture et séparation des acides gras*

Après 8 jours d'incubation, le contenu des 5 boîtes est récolté puis malaxé dans un mortier avec du sable de Fontainebleau, préalablement lavé et séché.

Les acides gras et les triglycérides non hydrolysés sont extraits par un mélange, volume à volume, d'éther éthylique et d'éther de pétrole purifiés, dans un appareil SOXHLET.

La phase éthérée est versée dans une ampoule à décanter et neutralisée en présence de phénolphtaléine par une solution de soude diluée N/100. Après décantation, la phase aqueuse contenant les acides gras sous forme de sels de sodium

est soutirée dans un tube à essais bouché émeri, placé dans un bain réfrigérant (+ 4 °C). Sont ajoutés 3 ml d'hexane purifié puis, goutte à goutte, une solution d'acide sulfurique N, jusqu'au virage de l'indicateur. Le tube est agité énergiquement et les acides gras déplacés passent en solution dans l'hexane.

Après décantation, 1 ml de la solution d'hexane est prélevé et versé dans un tube en pyrex bouché émeri.

### 2.3. *Estérification des acides gras*

Elle est réalisée selon la méthode décrite par CLEMENT et BEZARD (1961).

Le contenu du tube est séché à l'aide d'un courant d'azote. On y ajoute 1 ml de butanol purifié, puis une goutte d'acide sulfurique pur. Le tube fermé hermétiquement est alors maintenu au-dessus d'un bain marie bouillant pendant 4 heures. Après refroidissement, on ajoute 3 ml d'une solution de carbonate bipotassique à 5 p. 100 et le tube est centrifugé à 3 000 tours/minute pendant 5 minutes. On recueille la phase butanolique qui renferme les acides gras sous la forme d'esters butyliques. Ces esters sont lavés à l'eau distillée jusqu'à pH 7,0 puis filtrés sur papier pour éliminer l'excès d'eau (BOUDON, 1976).

La phase butanolique ainsi obtenue est prête à être injectée dans un chromatographe à phase gazeuse. La quantité injectée est de 0,2 nl pour chaque échantillon.

### 2.4. *Identification des acides gras*

Elle est réalisée par chromatographie en phase gazeuse mettant en œuvre un appareil aux caractéristiques suivantes :

- Marque Girdel 3 000.
- Colonne capillaire en verre : longueur 100 m, diamètre 0,5 mm.
- Phase stationnaire Carbowax 20 M, et acide téréphtalique (CHRISTIE, 1968).
- Nombre de plateaux théoriques : 70 000.
- Enregistreur : Sefram.
- Intégrateur : L.T.T. 4412.
- Diviseur d'entrée : 1 p. 100.
- Température isotherme : 195 °C.
- Température de l'injecteur : 210 °C.
- Gaz vecteur $N_2$ : débit 2 ml/mn.
- Pression 0,5 bar.

## Résultats

### I. — *Activité lipolytique des souches de levures isolées*

Sur les 372 souches de levures retenues, 51 soit 13 p. 100 présentent une activité lipolytique.

Ces 51 souches appartiennent à 14 espèces identifiées par le Centraalbureau voor Schimmelcultures (Delft, Netherlands). Leur fréquence à l'isolement est consignée dans le tableau 1.

TABLEAU 1

*Identité des souches de levures lipolytiques isolées des denrées alimentaires examinées*

| Levures lipolytiques identifiées | Fréquence à l'isolement |
|---|---|
| *Candida curvata* (DIDDENS et LODDER) | 5 |
| *Candida deformans* (ZACH) | 3 |
| *Candida humicola* (DASZEWESKA, DIDDENS et LODDER) | 3 |
| *Candida lipolytica* (HARRISON) | 4 |
| *Candida parapsilosis* (ASH) (LANGERON et TALICA) | 4 |
| *Candida zeylanoïdes* (CAST), LANGERON et GUERRA | 2 |
| *Cryptococcus laurentii* (KUFF), SKIMMER | 5 |
| *Cryptococcus uniguttulatus* (ZACH) PHAFF et FELL | 2 |
| *Rhodotorula glutinis* (FRES) HARRISON | 4 |
| *Rhodotorula pilimanae* (HEDRICK et BURKE) | 2 |
| *Rhodotorula rubra* (DEMME), LODDER | 7 |
| *Saccharomycopsis lipolytica* (WICKERHAM) | 4 |
| *Torulopsis ingeniosa* (DI MENA) | 1 |
| *Trichosporon cutaneum* (DE BEURM *et al.*) | 5 |
| Total des souches identifiées | 51 |

L'activité lipolytique des espèces isolées permet de les classer en deux groupes :

*a*) Les levures dont l'aptitude à la lipolyse est très peu développée. Ce groupe comprend des espèces pigmentées représentées par le genre *Rhodotorula* : *R. glutinis*, *R. pilimanae*, *R. rubra*. Dans ce groupe figurent également quelques espèces non pigmentées, notamment : *Candida zeylanoïdes*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Torulopsis ingeniosa*.

*b*) Les levures dont l'aptitude à la lipolyse est très développée et dont l'activité s'étend à l'hydrolyse d'un grand nombre de triglycérides. Dans ce groupe le genre *Candida* est représenté par les espèces : *C. curvata*, *C. deformans*, *C. humicola*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis*. On note également la présence de *Cryptococcus laurentii*, *Saccharomycopsis lipolytica* et *Trichosporon cutaneum*. Cette dernière espèce est dotée de propriétés lipolytiques très développées.

Le tableau 2 précise l'activité lipolytique, vis-à-vis des 10 substrats mis en œuvre, de l'ensemble des espèces constituant les deux groupes.

TABLEAU 2

*Caractérisation de l'activité lipolytique des souches de levures isolées des denrées alimentaires examinée*

| Aspect des Colonies | Espèces identifiées | Mise en évidence des enzymes lipolytiques | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Esterases | Tributyrinase | Glycérol ester hydrolases sur huile de | | | | | | |
| | | | | Beurre | Margarine | Arachide | Colza | Olive | Palme | Soja | Tournesol |
| Pigmentées | *Rhodotorula glutinis* . . . . . | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| | *Rhodotorula pilimanae* . . . . | | | | | | | | | | |
| | *Rhodotorula rubra* . . . . . | | | | | | | | | | |
| Non pigmentées | *Candida zeylanoïdes* . . . . | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| | *Cryptotoccus uniguttulatus* . . | | | | | | | | | | |
| | *Torulopsis ingeniosa* . . . . | | | | | | | | | | |
| | *Candida curvata* . . . . . | + | + | + | + | + | — | + | + | — | + |
| | *Candida deformans* . . . . . | — | + | + | + | + | — | + | + | — | + |
| | *Candida humicola* . . . . . | + | + | + | + | + | — | + | + | — | + |
| | *Candida lipolytica* . . . . . | + | + | + | + | + | — | + | + | + | + |
| | *Candida parapsilosis* . . . . . | + | + | + | + | + | — | + | + | — | + |
| | *Cryptococcus laurentii* . . . . . | + | + | + | + | + | — | + | + | — | + |
| | *Saccharomycopsis lipolytica* . . | + | + | + | + | + | — | + | + | — | + |
| | *Trichosporon cutaneum* . . . . | + | + | + | + | + | — | + | + | + | + |

— Sans action sur le substrat.
± Faiblement lipolytique.
\+ Très lipolytique.

## II. — *Étude comparée de l'hydrolyse des triglycérides de l'huile de beurre par diverses souches de levures*

Les souches de levures suivantes, isolées précédemment et caractérisées par leur fréquence élevée dans les denrées alimentaires étudiées, ont été retenues : *Candida curvata, Candida lipolytica, Cryptococcus laurentii* et *Trichosporon cutaneum*.

La figure 2 présente le profil chromatographique témoin. Les figures 3, 4, 5 et 6 présentent les différents profils des acides gras libérés des triglycérides de l'huile de beurre par les quatre souches de levures lipolytiques étudiées.

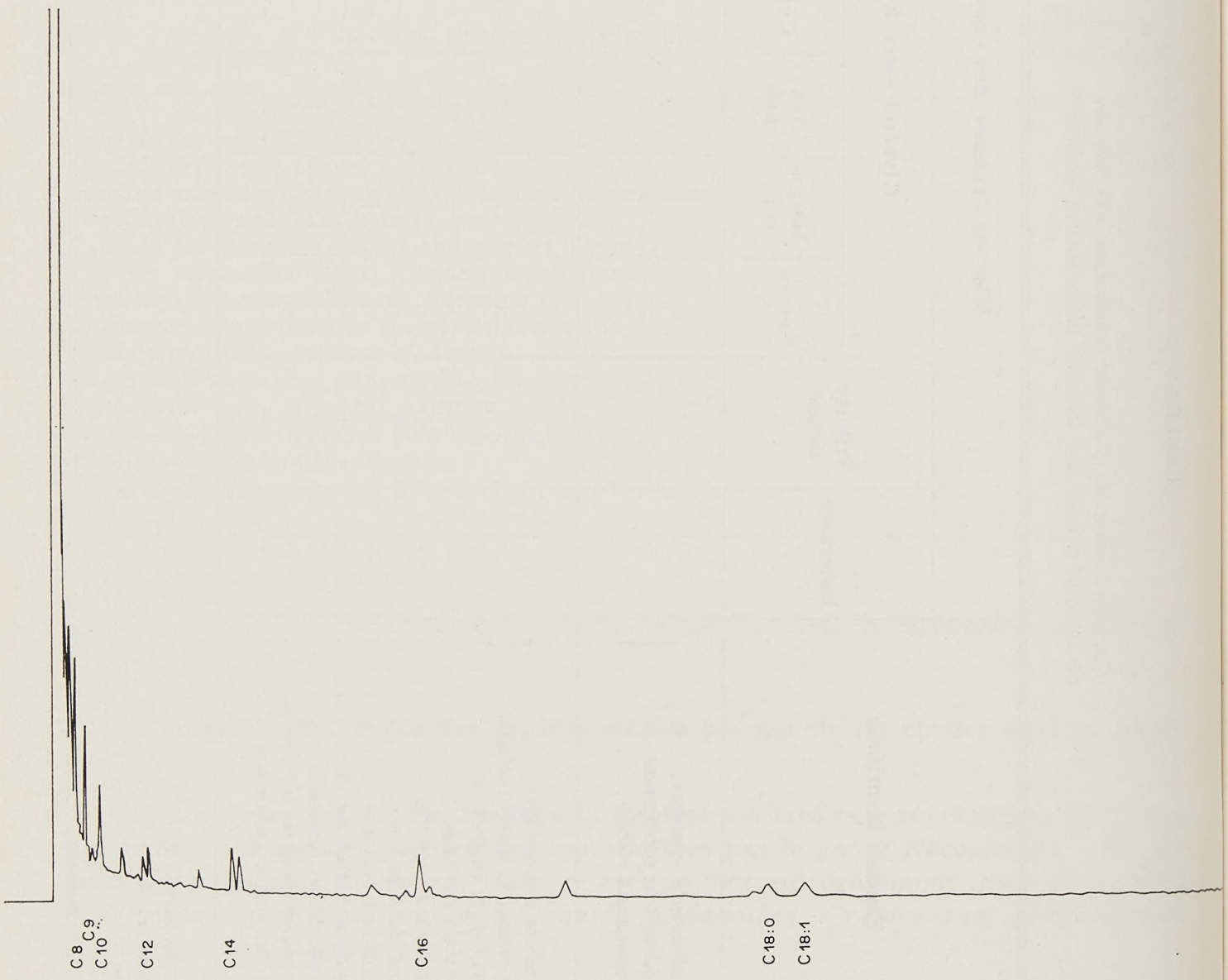



FIG. 2. — *Profil témoin (huile de beurre non hydrolysée).*

Le tableau 3 groupe les résultats tirés de l'analyse des différents profils.

Ces résultats sont exprimés en pour cent des acides gras totaux libérés à partir des triglycérides de l'huile de beurre.

Ils mettent en évidence la libération d'acides gras peu courants : acides en $C_9$, $C_{11}$, $C_{13}$, $C_{15}$ et $C_{19}$ sous leurs formes saturées et insaturées.

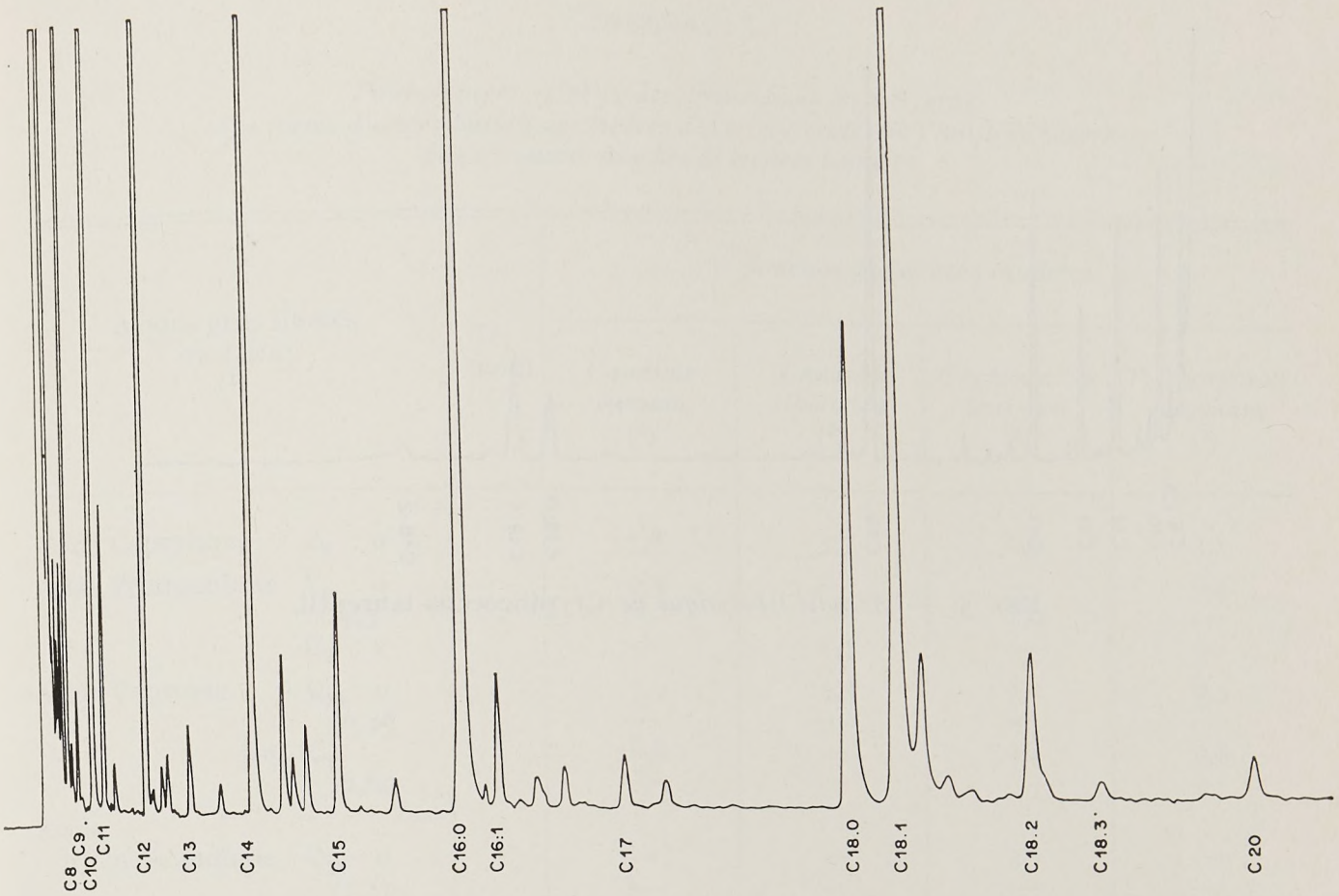



FIG. 3. — *Activité lipolytique de* Candida curvata.

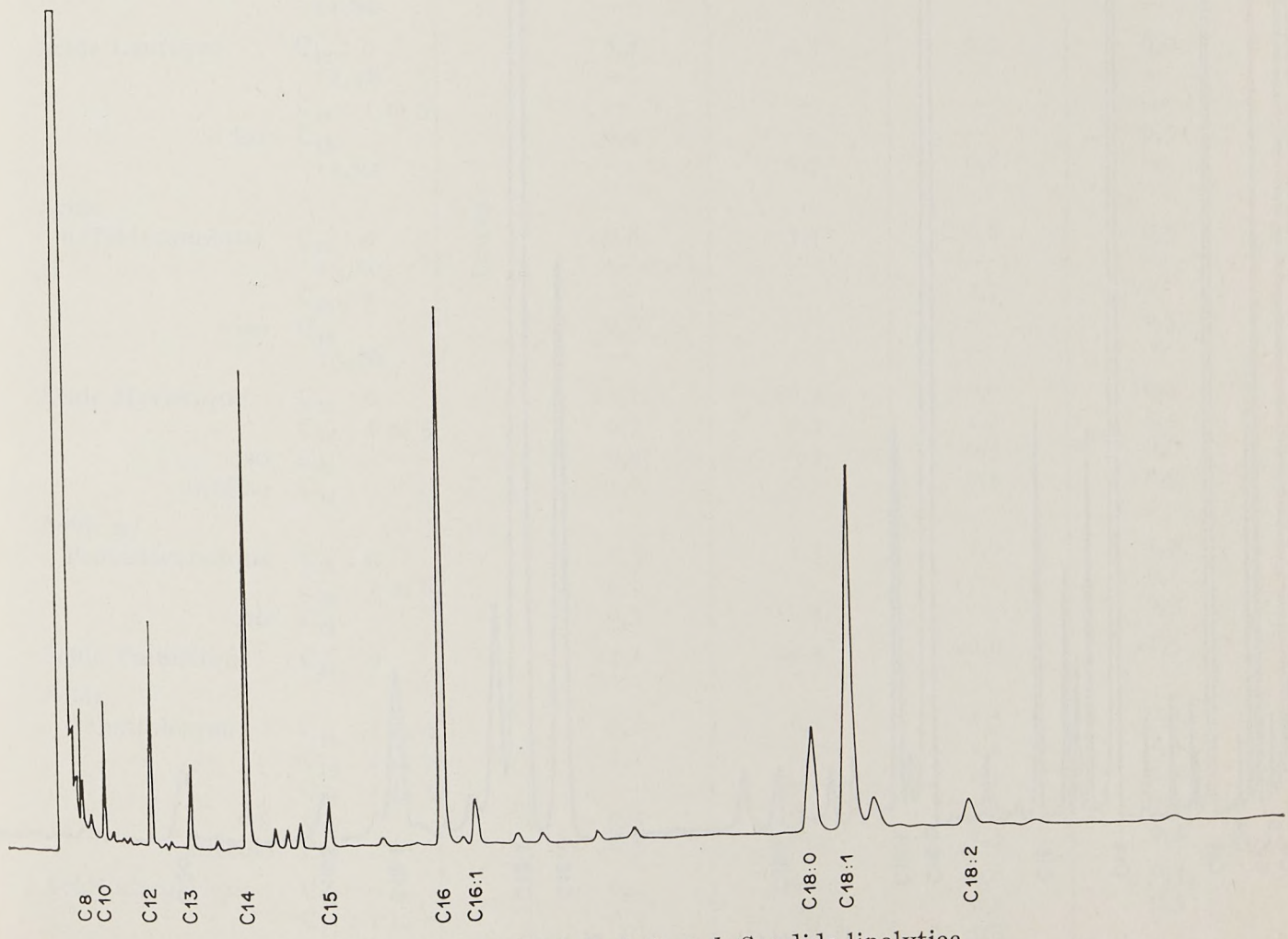



FIG. 4. — *Activité lipolytique de* Candida lipolytica.

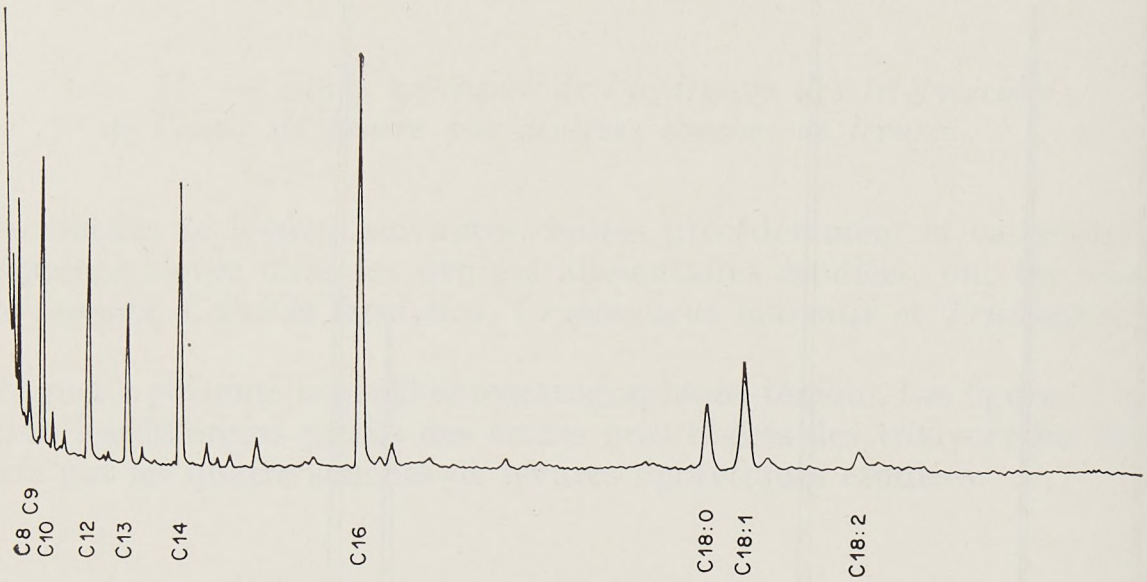



FIG. 5. — *Activité lipolytique de* Cryptococcus laurentii.

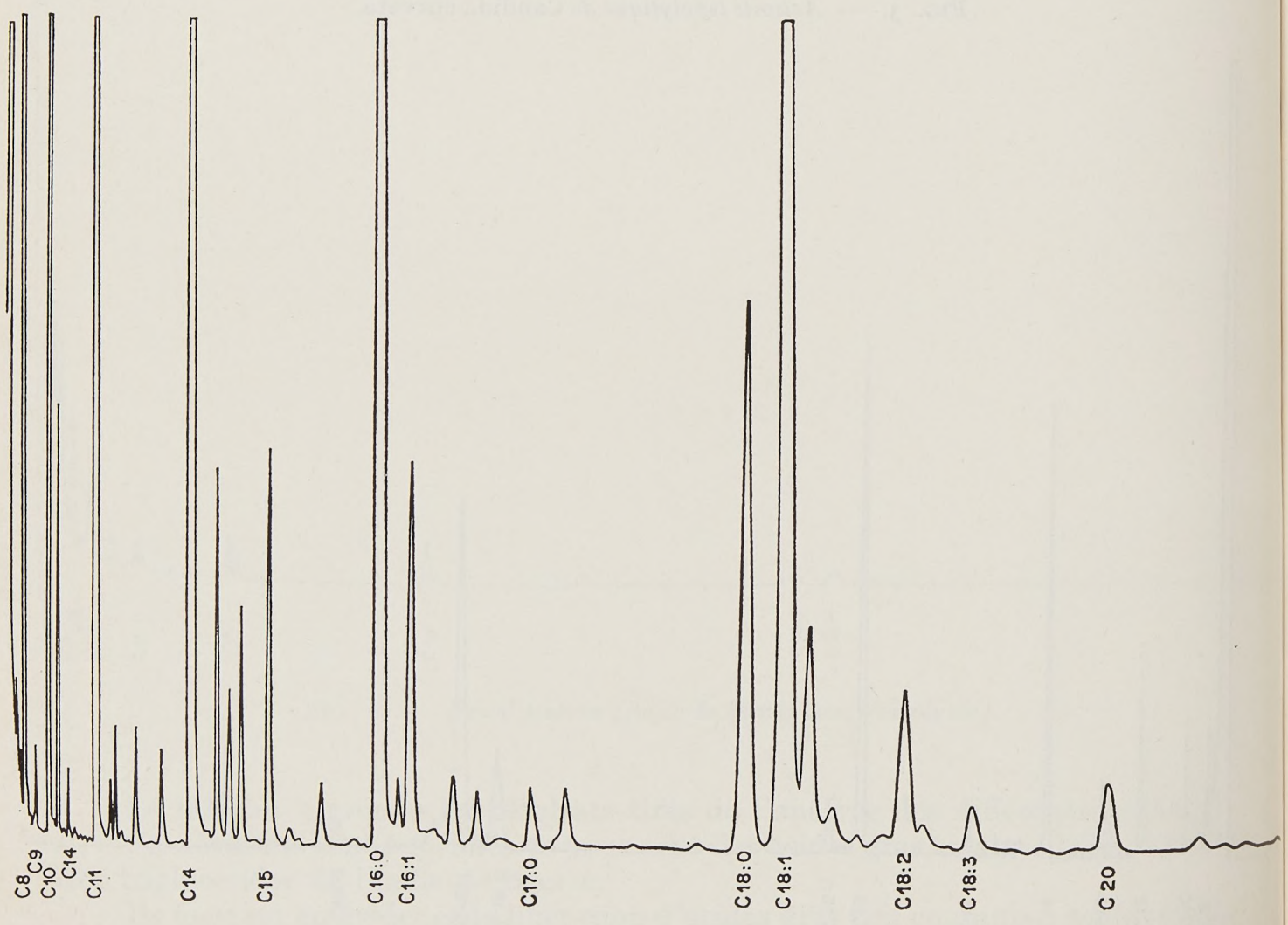



FIG. 6. — *Activité lipolytique de* Trichosporon cutaneum.

## Tableau 3

*Pourcentages relatifs des principaux acides gras sous forme d'esters butyliques libérés des triglycérides de l'huile de beurre par les quatre souches de levures étudiées*

| Acides gras libérés ou L.E.C. (1) | | Témoin | Souches de levures étudiées | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *Candida curvata* (2) | *Candida lipolytica* (2) | *Cryptococcus laurentii* (2) | *Trichosporon cutaneum* (2) |
| Acide Caprylique | $C_8$ : 0 | | 7,8 | 3,7 | 6,5 | 3,1 |
| Acide Pélargonique | $C_9$ : 0 | | 0,5 | — | — | 0,4 |
| | 9,5 | | — | — | 2,6 | — |
| | $C_9$ : 1 | | — | 1,7 | — | — |
| Acide Caprique | $C_{10}$ : 0 | | 7,0 | 5,3 | 8,1 | 6,5 |
| | 10,48 | | — | — | — | — |
| iso | $C_{11}$ | | 0,8 | — | 2,4 | 0,8 |
| | 10,60 | | — | — | — | — |
| Acide n/Undécanoïque | $C_{11}$ : 0 | | — | — | 3,1 | — |
| | 11,10 | | — | — | — | — |
| | $C_{11}$ : 1 | | — | — | — | — |
| | 11,64 | | — | — | — | — |
| | 11,80 | | — | — | — | — |
| Acide Laurique | $C_{12}$ : 0 | | 5,4 | 4,3 | 6,7 | 6,0 |
| | 12,28 | | — | — | — | — |
| | $C_{12}$ : 1 ω 5 | | — | — | — | — |
| iso | $C_{13}$ | | 0,4 | — | — | 0,5 |
| | 12,62 | | — | 0,7 | 0,8 | — |
| Acide n/Tridécanoïque | $C_{13}$ : 0 | Traces | 0,8 | 3,4 | 0,8 | 0,5 |
| | 13,10 | | — | — | — | — |
| | $C_{13}$ : 1 | | — | — | 2,7 | — |
| iso | $C_{14}$ | | 0,6 | — | — | 0,5 |
| | 13,70 | | — | — | — | — |
| Acide Myristique | $C_{14}$ : 0 | | 11,1 | 10,9 | 10,0 | 16,4 |
| | $C_{14}$ : 1 ω 5 | | 0,7 | 0,5 | 1,2 | 1,4 |
| iso | $C_{15}$ | | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,6 |
| antéiso | $C_{15}$ | | 1,0 | 0,7 | 0,5 | 0,9 |
| Acide n/Pentadécanoïque | $C_{15}$ : 0 | | 1,5 | 1,3 | 1,6 | 1,7 |
| | $C_{15}$ : 1 ω 8 | | 0,2 | — | — | 0,1 |
| iso | $C_{16}$ | | 0,3 | 0,4 | — | 0,3 |
| Acide Palmitique | $C_{16}$ : 0 | | 24,1 | 20,4 | 20,6 | 21,5 |
| Acide Palmitoléique | $C_{16}$ : 1 ω 9 | | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,4 |
| | $C_{16}$ : 1 ω 7 | | 1,1 | 1,7 | 2,1 | 2,4 |
| | $C_{16}$ : 1 ω 5 | | — | — | — | 0,1 |
| iso | $C_{17}$ | | 0,3 | 0,3 | 1,1 | 0,4 |
| antéiso | $C_{17}$ | | 0,3 | 0,4 | 1,3 | 0,4 |
| Acide Margarique | $C_{17}$ : 0 | | 0,5 | 0,4 | 0,8 | 0,4 |
| | $C_{17}$ : 1 ω 8 | | 0,3 | 0,7 | 0,9 | 0,5 |

TABLEAU 3 *(Suite)*

| Acides gras libérés ou L.E.C. (1) | | Témoin | Souches de levures étudiées | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *Candida curvata* (2) | *Candida lipolytica* (2) | *Cryptococcus laurentii* (2) | *Trichosporon cutaneum* (2) |
| Acide Stéarique | $C_{18}$ : 0 | Traces | 7,6 | 8,7 | 5,7 | 5,8 |
| Acide Oléique | $C_{18}$ : 1 ω 9 | | 19,2 | 27,9 | 10,4 | 18,6 |
| Acide Vaccénique | $C_{18}$ : 1 ω 7 | | 2,6 | 3,1 | 1,4 | 2,7 |
| | $C_{18}$ : 1 ω 6 | | 0,3 | — | — | 0,6 |
| | $C_{18}$ : 1 ω 5 | | 0,1 | — | — | 0,1 |
| | 18,52 | | — | — | — | 0,3 |
| Acide Linoléique | $C_{18}$ : 2 ω 6 | | 2,9 | 2,3 | 3,7 | 2,1 |
| | 18,82 | | 0,2 | 0,4 | — | 0,6 |
| Acide n/ Nonadécanoïque | $C_{19}$ : 0 | | — | — | — | 0,1 |
| | $C_{19}$ : 1 ω 12 | | — | — | — | 0,1 |
| | $C_{19}$ : 1 ω 9 | | — | — | — | — |
| Acide Linolénique | $C_{18}$ : 3 ω 3 | | 0,6 | — | — | 0,1 |
| | 19,44 | | — | — | — | 0,2 |
| Acide Arachidique | $C_{20}$ : 0 | | — | — | — | 0,1 |
| | 20,07 | | — | — | — | 0,4 |
| Acide Gadoléique | $C_{20}$ : 1 ω 5 | | — | — | — | 0,2 |
| Acides non dosés | | | 1,0 | 0,1 | 4,0 | 2,2 |

(1) Les résultats sont exprimés en acides gras ou en longueurs équivalentes de chaîne (L.E.C.) selon la méthode décrite par MIWA *et al.* (1960).

(2) Le signe (—) signifie que les acides gras ou les L.E.C. ont été décelés à l'état de traces, et par conséquent n'ont pu être figurés quantitativement.

Dans le tableau 4, nous avons rapproché le degré de lipolyse des triglycérides de l'huile de beurre provoquée par les quatre souches de levures étudiées et la composition moyenne en acides gras de l'huile de beurre signalée par GALLACIER *et al.* (1974).

L'examen de ce tableau montre que les quatre souches présentent une aptitude voisine à libérer les acides gras à chaînes courtes : acides caprylique, caprique et laurique. En outre, *Candida lipolytica* semble montrer une spécificité pour l'acide oléique et *Trichosporon cutaneum* pour l'acide myristique.

Le tableau 5 résume l'activité lipolytique des enzymes des quatre souches étudiées, vis-à-vis des acides gras insaturées en $C_{18}$ de l'huile de beurre. Il ressort de ce tableau que les lipases de ces souches, tout en libérant à partir des triglycérides de l'huile de beurre des quantités voisines de ces acides gras, agissent sélectivement selon la position des doubles liaisons sur les chaînes de ces mêmes acides gras.

TABLEAU 4

*Rapport entre le degré de lipolyse des triglycérides de l'huile de beurre provoquée par les quatre souches de levures étudiées et la composition moyenne de l'huile de beurre en acides gras*

| | Composition moyenne des triglycérides de l'huile de beurre en pour cent du total des principaux acides gras (1) | Pour cent des principaux acides gras libérés des triglycérides de l'huile de beurre par quatre souches de levures lipolytiques | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *Candida curvata* | *Candida lipolytica* | *Cryptococcus laurentii* | *Trichosporon cutaneum* |
| Acides gras saturés | Acide Butyrique : 3,0 à 4,0 . . | | | | |
| | Acide Caproïque : 2,0 à 2,6 . . | | | | |
| | Acide Caprylique : 1,2 à 1,5 . . | 7,8 | 3,7 | 6,5 | 3,1 |
| | Acide Caprique : 2,4 à 3,2. . . | 7,0 | 5,3 | 8,1 | 6,5 |
| | Acide Laurique : 2,7 à 4,1. . . | 5,4 | 4,3 | 6,7 | 6,0 |
| | Acide Myristique : 9,5 à 12,0 . | 11,1 | 10,9 | 10,0 | 16,4 |
| | Acide Pentadécanoïque : 1,2 à 1,6 | 1,5 | 1,3 | 1,6 | 1,7 |
| | Acide Palmitique : 24,0 à 32,0 . | 24,1 | 20,6 | 22,7 | 21,5 |
| | Acide Stéarique : 9,5 à 13,0.. . | 7,6 | 8,1 | 5,7 | 5,8 |
| | Acide Arachidique : 0,2. . . . | — | — | — | 0,1 |
| Acides gras insaturés | Acide Palmitoléique : 1,8 à 2,3 | 1,3 | 2,0 | 2,6 | 2,8 |
| | Acide Oléique : 21,0 à 29,0. . . | 19,2 | 27,9 | 10,4 | 18,6 |
| | Acide Vaccénique<br>Acide Linoléique<br>Acide Linolénique } 4,5 à 10,0 | 6,7 | 5,4 | 5,1 | 6,5 |
| | Acide Arachidonique : 0,3 . . | — | — | — | — |

(1) Les proportions d'acides gras figurant dans ce tableau représentent des moyennes de résultats obtenus en France sur des laits de grands mélanges. (Gallacier J.P., Barbier J.P., Kuzdzal-Savoie S., 1974).

TABLEAU 5

*Proportions relatives des acides gras en $C_{18}$ hydrolysés en fonction de la position de la double liaison*

| Acides gras ou L.E.C. | Souches de levures lipolytiques étudiées | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *Candida curvata* | *Candida lipolytica* | *Cryptococcus laurentii* | *Trychosporon cutaneum* |
| $C_{18}$ : 1 ω 7. . . . . | 2,6 | 3,1 | 1,4 | 2,7 |
| $C_{18}$ : 1 ω 6. . . . . | 0,3 | — | — | 0,6 |
| $C_{18}$ : 1 ω 5. . . . . | 0,1 | — | — | 0,1 |
| 18, 52 . . . . . | — | — | — | 0,3 |
| $C_{18}$ : 2 ω 6. . . . . | 2,9 | 2,3 | 3,7 | 2,1 |
| 18, 82 . . . . . | 0,2 | 0,4 | — | 0,6 |
| $C_{18}$ : 3 ω 3. . . . . | 0,6 | — | — | 0,1 |
| | 6,7 | 5,8 | 5,1 | 6,5 |

## Discussion

L'analyse des résultats montre que chez les levures lipolytiques étudiées les enzymes estérases et glycérol ester hydrolases sont inégalement réparties.

Les estérases se rencontrent chez les espèces pigmentées appartenant au genre *Rhodotorula (R. glutinis, R. pilimanae, R. rubra)*, mais aussi chez certaines espèces non pigmentées appartenant au genre *Candida (C. zeylanoïdes)* au genre *Cryptococcus (Cryptococcus uniguttulatus)* et au genre *Torulopsis (Torulopsis ingeniosa)*.

Toutes ces souches hydrolysent également la tributyrine. Leur action sur ce triglycéride synthétique est probablement due à sa relative solubilité dans l'eau.

Les lipases vraies se rencontrent chez les levures non pigmentées parmi lesquelles les espèces appartenant au genre *Candida (C. curvata, C. deformans, C. humicola, C. lipolytica, C. parapsilosis)* ainsi que *Cryptococcus laurentii, Saccharomycopsis lipolytica* et *Trichosporon cutaneum*.

La mise en œuvre d'une colonne capillaire pour l'analyse chromatographique des produits de l'hydrolyse des triglycérides de l'huile de beurre a permis d'identifier les acides gras supérieurs à $C_6$.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence les acides butyrique et caproïque. Cela est probablement du au fait que la méthode analytique retenue impose certaines contraintes dans la préparation des échantillons. Ceux-ci en effet doivent être lavés après butylation en milieu sulfurique, jusqu'à pH 7,0, avant d'être injectés dans la colonne. Ces lavages répétés doivent entraîner les acides en $C_4$ et $C_6$, partiellement solubles dans l'eau.

En ce qui concerne la libération des autres acides gras, les souches de levures lipolytiques étudiées ont révélé des aptitudes variables.

## Conclusion

Notre étude a mis en évidence la présence de levures lipolytiques dans des denrées alimentaires très variées.

La méthode de dissémination sur milieu gélosé contenant différents substrats lipidiques nous a permis de distinguer les levures possédant une estérase (E.C. 3.1.1.1.) de celles secrétant une lipase vraie, c'est-à-dire une glycérol ester hydrolase (E.C. 3.1.1.3.).

Nous avons analysé par chromatographie en phase gazeuse en utilisant une colonne capillaire, les produits de l'hydrolyse des triglycérides de l'huile de beurre par quatre souches de levures. Les résultats ont montré une libération spécifique, par les quatre souches, des acides caprylique, caprique et laurique. *Candida lipolytica* et *Trichosporon cutaneum* se caractérisent par une libération spécifique d'acide oléique pour la première et d'acide myristique pour la seconde.

Nous avons également noté une action sélective des lipases des quatre souches, fonction de la position des doubles liaisons des acides gras insaturés en $C_{18}$.

Enfin, bien que *Candida lipolytica* soit considérée comme l'espèce type de levure lipolytique, son activité lipasique vis-à-vis des triglycérides de l'huile de beurre est moins importante que celles de *Candida curvata* et de *Trichosporon cutaneum*.

*Reçu pour publication en octobre 1979.*

## Remerciements

L'auteur remercie M. Boudon (Station de Recherches de Nutrition — I.N.R.A. — C.N.R.Z. Jouy-en-Josas) du précieux concours qu'il lui a apporté pour l'analyse chromatographique des échantillons et l'interprétation des résultats.

Il remercie également MM. Choisy et Veisseyre qui l'ont aidé dans la conduite et la présentation de son travail.

## Summary

*Study of some lipolytic yeasts*

The ability of yeasts to lipolysis has been little studied so far. Only the species *Candida lipolytica* and *Candida paralipolytica* to have earned the attention of researchers.

However insofar as yeasts widespread especially in food products, we have attempted to determine whether other species had the same aptitude. From different foodstuffs, 372 strains were isolated and tested.

In the first stage, we brought out the lipolytic activity of the enzymes, esterases (E.C. 3.1.1.1.) and glycerol ester hydrolases (E.C. 3.1.1.3.) using as substratum: Tween 80, glycerol tributyrate and mixed triglycerids of animal and vegetable origin.

In the second stage, we examined the liberation of the fatty acids of triglycerids from butter oil by glycerol ester hydrolase of four strains chosen from among the previous one on account of their frequent occurrence in foodstuffs.

The method of analysis by gas liquid chromatography using a capillary column was used. It failed to allow the detection of $C_4$ and $C_6$ fatty acids.

However, we obtained a good resolution of the fatty acids from $C_8$ to $C_{20}$.

The identification of the liberated fatty acids showed that the lipases produced by the strains examined, behaved in a specific manner as regards caprilic, capric and lauric acids.

However *Candida lipolytica* releases preferentially oleic acid, whereas *Trichosporon cutaneum* schows a greater specifity with regard to myristic acid.

The strains of lipolytic yeasts used in the study were identified by the Centraalbureau voor Schimmelcultures (Delft, Netherlands).

## Références bibliographiques

Aboukheir S., Kilbertus G., 1974. Fréquence des levures dans les denrées alimentaires. *Ann. Nutr. Alim.*, **28**, 539-547.

Alford S. A., and Steinle E., 1966. Improved plating method for the détermination of microbial lipolysis. *Bact. Proc. A.*, 80-82.

Alifax R., 1958. Utilisation du monolaurate de sorbitol comme agent émulsionnant des graisses dans les milieux destinés à la recherche des microorganismes lipolytiques. *Le Lait*, (Tome 38) **373-374**, 129-134.

Audrey Jones, Richards T., 1952. Night blue and Victoria Blue as Indicators an lipolysis Media. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, **5**, 82-93.

Benham R. W., 1941. Cultural characteristics of *Pityrosporum ovale*, a lipolytic fungus. Nutrient an growth requierements. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N.Y., (46) 176.

Boudon M., 1976. Communication personnelle.

Brandl E., Sobeck-Sale W., Binder W., 1962. Vergleichende. Prüfung zweir methoden zurbestimmung fettspaltender mikroorganismen in Rochmilch. *XVI^e Congrès International de laiterie*, Copenhague, section VIII, **1**, 399-402.

Castagnon-Velez M., Inigo Leal G., 1973. Microorganisms in Margarin Deterioration. *LWT Report*, **6**, 2, 70-22.

Christie W. W., 1968. Chromatography of the isomeric methylene interrupted methyl cis-cis octadécadiénoates. *J. Chromatog.*, **37,** 27-32.

Clement G., Bezard J., 1961. Technique de dosage par chromatographie gaz liquide d'un mélange d'acides gras, du butanoïque au docosanoïque. *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris*, **253,** 564-566.

Dherbomez M., Lacrampe J.-L., Larrouquere J., 1975. Contribution à l'étude de *Candida lipolytica*. *Revue Française des Corps Gras*, **3,** 147-151.

Gallacier J.-P., Barbier J.-P., Kuzdzal-Savoie S., 1974. Variations saisonnières des proportions relatives d'acides gras d'un beurre de laiterie d'Ille-et-Vilaine. *Le Lait* (Tome LIV), **533-534,** 117-138.

Garrison E. R., Holder Mary A., 1963. Lipolytic Yeasts in Cream from Dairy Farms. *Bull. Ark. Exp. st.*, 672.

Hugo W. B., Beveridge E. G., 1962. A quantitative study of the lipolytic Activity of Single Strains of seven bacterial species. *J. Appl. Bact.*, **25,** (1), 72-82.

Ingram M., 1958. Yeast in food Spoilage. The Chemistry and Biology of Yeast by Cook. AH. Chap. XII 603.

Marks T. A., 1968. Studies on the specificity of Lipase system from *Geotrichum candidum*, *Lipids*, **3,** 143.

Miwa T. K., Kenneth L., Mikolasczar, Fontaine R., Earle and Ivan A., Wolff, 1960. Gas chromatography characterization of Fatty acids. Identification constants for mono and Dicarboxylic Methyl Ester. *Anal. chem.*, **32,** 1739-1742.

Mourey A, Aboukheir S., Kilbertus G., 1971. Pouvoirs hydrolytiques de levures isolées de produits carnés, lipolyse. *Industries Agricoles et Alimentaires*, **1,** 35-41.

Ota M., Huang P. T., 1933. Sur les champignons du genre *Pityrosporum Sabouraud*. *Ann. Parasit. hum. comp.*, **11,** 49.

Ota Y., Yamada K., 1966. Lipase from *Candida paralipolytica*, Part I, Anionic Surfactants as the Essential Activator in the Systems Emulsified by Polyvinyl Alcohol. *Agr. Biol. Chem.*, 30, **4,** 351-356.

Ota Y., Yamada K., 1966. Lipase from *Candida paralipolytica* Part. II, Alkalin Earth Metal ions at the cofactor in the Shaken system Containing no Emulsifier. *Agr. Biol. Chem.*, 30, **10,** 1030-1038.

Ota Y., Yamada K., 1967. Lipase from *Candida paralipolytica*. Part. III. Further Studies on the Activation of the Enzyme Systems with Bile or Calcium salts. *Agr. Biol. Chem.*, **7,** 809-816.

Peters I. I., Nelson F. E., 1961. Further Studies of the use *Candida lipolytica* in the manufacture of Blue Cheese. *Milk Prod. J.*, **52,** 10-13.

Proks, J. Dolezalek J., and Pech Z. A study on the coaction of the yeast of the genus *Torulopsis* on the formation of the Methyl Ketones in the Cheese of Roquefort Type. *XV Int. Dairy Congress*, Londres, **2,** 729-734.

Randjandiche M., 1976. Obtention de la forme mycélienne de *Pityrosporum ovale*. *Bull. de la Société de Mycologie médicale*, **2,** 85-90.

Rath S., 1961. Ein Versuch zur Verbesserung der Methodik zur quantitativen Ermittlung lipolytischer. *Milchw. Beritche Wolfpassing u Rotholz*, **11,** 97.

Shifrine M., Marr A. G., 1963. The requierements of Fatty Acids by *Pityrosporum ovale*. *I. Gen. Microbiol.*, **32,** 263-270.

Sierra G., 1957. A simple method for the détection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrats. *Antonie van Leuwenhoeck*, **23,** 15-22.

Sjosrtöm G., 1959. Lipase problems in milk and Dairy Products. A Review. Rep. *Milk and Dairy Research Alnarp Sweden*, **58,** 1-48.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (3), 273-286.

# Effets de l'acide ascorbique et du chlorhydrate de cystéine sur les propriétés rhéologiques des pâtes de farine de blé appréciées à l'aide de l'alvéographe et du farinographe

M. BERGER et P. GRANDVOINNET
*Laboratoire de Recherches des Grands Moulins de Pantin,*
*62, rue du Louvre, 75002 Paris*

## Résumé

L'étude porte sur l'observation des effets dans les pâtes d'adjonction de chlorhydrate de cystéine (CSH) et/ou d'acide ascorbique (AA).

A l'alvéographe et au farinographe il est mis en évidence une dose de CSH au-delà de laquelle, quelles que soient les quantités d'AA ajoutées, les effets du réducteur ne sont plus réversibles.

Cette dose limite est celle qui permet d'observer une constante de relaxation nulle et un allongement maximum en l'absence d'oxydant à l'alvéographe, et l'apparition d'une déformation caractéristique sur les farinographes.

Il est également montré que l'adjonction raisonnée de ces produits seuls ou en mélange, à une farine type boulangerie permet l'obtention de farines pouvant théoriquement convenir à la fabrication de biscuits ou de biscottes.

Mots clés : *alvéographe Chopin ; farinographe de Brabender ; acide ascorbique ; cystéine ; composantes principales ; analyse de variance.*

## I. — Introduction

Le marché actuel des industries de cuisson à base de farine de blé exige la fabrication de produits élaborés et diversifiés. Cette évolution se traduit, au niveau de la meunerie, par une demande de farine répondant à des critères précis. Cette diversité qualitative s'accompagne d'une diminution des quantités de chacun des types de farine.

S'il est possible de répondre à l'aspect qualitatif par une politique d'achat des blés et de classement à leur réception, la contrepartie quantitative reste, de par l'inertie inévitable des installations de mouture, le principal facteur limitant. Nous avons étudié dans quelle mesure l'adjonction d'oxydants et/ou de réducteurs à une farine de blé de qualité moyenne permet l'obtention de farines utilisables en biscuiterie ou en boulangerie.

Le peu de publications françaises en ce domaine s'explique par notre législation restrictive et par la qualité des blés indigènes. Citons les travaux anciens de GUILLEMET et SONNTAG (1943), GUILLEMET et HAEGEL (1944) qui ont étudié l'action de l'eau oxygénée et, conséquence de son comportement particulier dans les pâtes, de l'acide ascorbique pour les oxydants, de la cystéine, des sulfites et des cyanures pour les réducteurs.

Plus récemment, FEILLET (1965) a décrit les modes d'action des oxydants et réducteurs et CALVEL (1968) a étudié l'emploi de l'acide ascorbique en panification.

A l'opposé les recherches anglo-saxonnes, tant théoriques que pratiques (chemical dough development), ont fait l'objet de nombreuses publications dont BLOKSMA en 1971, puis en 1975 a publié une très importante monographie.

Nous avons limité notre étude à l'acide ascorbique (AA) et à la cystéine (CSH) pour les raisons suivantes :

— l'acide ascorbique est le seul additif de synthèse actuellement autorisé en France.

— la CSH, comme le glutation, possède non seulement une réactivité importante vis-à-vis des protéines, mais également une très faible toxicité aiguë ($DL_{50}$ = 3 g/kg).

On doit cependant citer les travaux de SCHWARTZ-TIENE (1957) qui montrent que l'ingestion répétée de doses très importantes de CSH (3 g/kg) provoque chez le rat des lésions rénales au niveau des glomérules.

## II. — Matériel et méthodes

### *Matériel*

1. — *Farines* : de par la nature même des produits testés et le nombre d'expériences effectuées, tous les essais n'ont pu être entrepris avec une même farine. Nous avons utilisé des farines industrielles (N × 5,7 = 10,5 p. 100 en MS) obtenues par mouture de mélange de blés de pays, exemptes d'adjuvants fève et acide ascorbique.
2. — *Produits* : acide ascorbique de qualité alimentaire chlorhydrate de cystéine RP PROLABO (CSH). Ces deux produits sont introduits dans la pâte aux doses de 0, 57, 114, 227 et 341 nM par gramme de farine par l'intermédiaire de l'eau d'hydratation.
3. — *Appareillage* : alvéographe CHOPIN. L'appareil classique a été relié à une bouteille d'air comprimé pour permettre une déformation des éprouvettes de pâte à un débit d'air constant (96 l/heure).

farinographe BRABENDER équipé du pétrin de 300 g.

### *Méthodes*

1. — *Expérimentales*

*A l'alvéographe :*

A l'exception d'une étude séparée dans laquelle les réactifs ont été mélangés à l'état pulvérulent avec la farine, l'adjonction de produits a été faite par l'intermédiaire de l'eau de coulage.

Le mode opératoire utilisé pour le pétrissage et la déformation est celui décrit dans la norme AFNOR V 03 710.

Une partie de l'étude comporte des essais de relaxation structurale selon la

méthode de HLYNKA et BARTH (1955), les éprouvettes de pâte ont été déformées après 5, 10, 20 et 30 minutes de repos.

Cette méthode est basée sur l'étude de l'évolution en fonction du temps de repos ($t$), de la surpression interne ($P_2$) mesurée à volume d'air insufflé constant. La linéarisation de cette fonction obtenue en portant $P_2$. $t = f(t)$ permet de résumer son étude à celle de ses deux paramètres caractéristiques. HLYNKA définit alors :

- la constante de relaxation (CR) à partir de l'ordonnée à l'origine,
- la contrainte asymptotique (CA) à partir du coefficient angulaire de la droite.

Sur les alvéographes enregistrés, nous avons également relevé les paramètres suivants :

- la suppression maximale P qui est la moyenne des ordonnées maximales mesurée en millimètres et multipliée par 1,1. Elle est en relation avec la résistance de la pâte à la déformation;
- l'abcisse moyenne à la rupture de chaque courbe, elle est à une constante près (le volume d'air initialement insufflé pour décoller l'éprouvette de pâte), proportionnelle au volume d'air moyen nécessaire pour rompre la membrane de la bulle de pâte;
- le travail de déformation W, exprimé en $10^{-4}$ joules, est le travail nécessaire à la déformation jusqu'à rupture de la bulle de 1 g de pâte.

*Au farinographe :*

Les paramètres relevés sur les courbes d'enregistrement désignés sur la figure 1

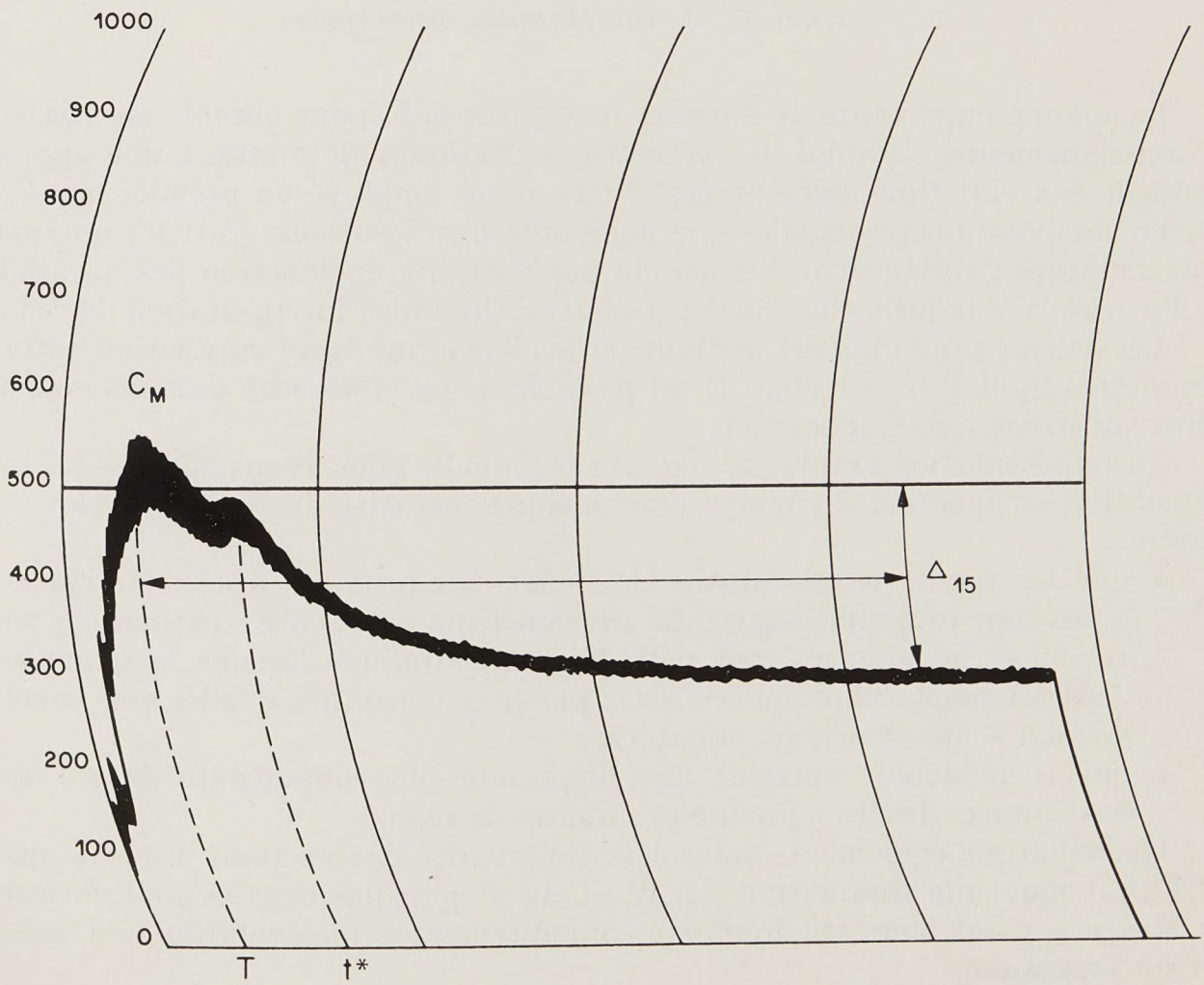



FIG. 1. — *Enregistrement au farinographe d'une courbe caractéristique d'un excès de CSH.*

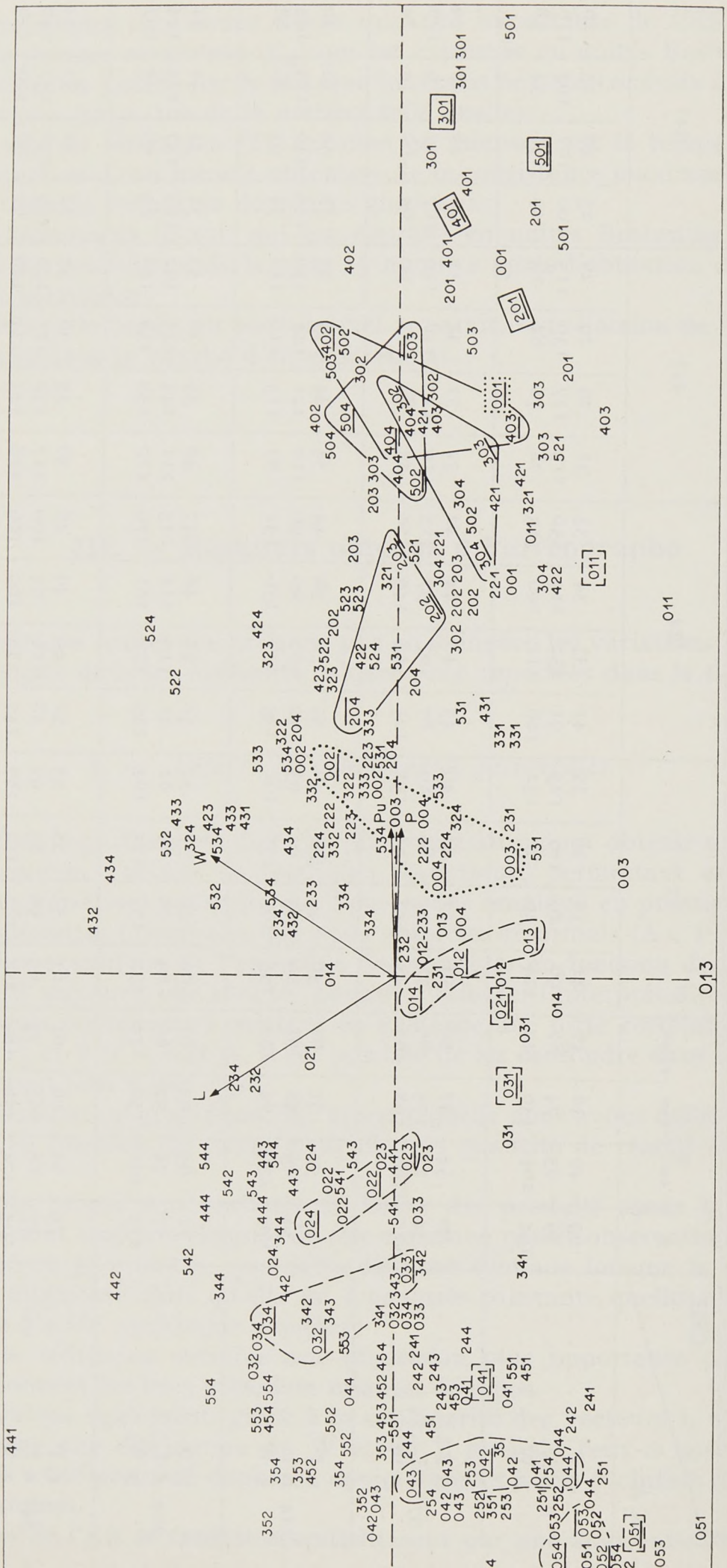

W
L
P
Pu
013

FIG. 2. — *Analyse en composantes principales des données alvéographiques : Code des points.*

| Centaines = AA en nMoles/g | | Dizaine = CSH nMoles/g | | Unités = mn | |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | 1 | 28 | 1 | 5 |
| 2 | 57 | 2 | 57 | 2 | 10 |
| 3 | 114 | 3 | 114 | 3 | 20 |
| 4 | 227 | 4 | 227 | 4 | 30 |
| 5 | 341 | 5 | 341 | | |

Nombre de points représentés : 215.
Nombre de points non représentés : 11.
Évolution en fonction de la durée de repos après action des produits seuls.

————AA
----------CSH

□ AA après 5 mn
⬚ CSH après 5 mn

## 2. — *Analyse de variance*

L'A.C.P. ayant mis en évidence le comportement singulier des données obtenues après 5 minutes de repos, nous avons précisé l'étude des résultats obtenus après 10, 20, 30 minutes de repos par analyse de la variance, ainsi que le sens général des variations observées. Les conclusions sont reportées dans le tableau 2.

TABLEAU 2

*Tableau récapitulatif des analyses de variances effectuées sur les alvéogrammes après 10, 20, 30 minutes de repos*

| Variables \ Paramètres contrôlés | CSH | AA | $t$ | CSH × AA | CSH × $t$ | AA × $t$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $P_1$, $P_2$ . . . . . | S↘ | S↗ | S⌒ | S | S | NS |
| L . . . . . | S↗ | NS | S⌒ | S | NS | NS |
| W . . . . . | S↘ | S↗ | NS | S | NS | NS |

S = Significatif au seuil $\alpha = 0{,}01$.
NS = Non significatif.
← indique le sens général de la variation observée.

L'analyse de variance permet, par des tests statistiques, de s'assurer de la validité (par rapport à la reproductibilité des essais) des différences observées. Il se dégage de cette analyse :

- l'absence d'action de l'acide ascorbique sur L et d'interaction AA × t pour toutes les variables ;
- la présence d'une interaction CSH × AA ; celle-ci est faible puisqu'elle disparaît (à part pour P) lorsque l'on fait des analyses temps par temps des données, ce qui diminue la puissance du test. On peut admettre, du moins pour W, qu'un modèle additif rend compte de l'action conjuguée de ces deux composés ; quant à L, nous ne prendrons en considération que la CSH et le temps comme variables explicatives.

### 3. — *Évolution des différents paramètres alvéographiques*

En dernier lieu, nous avons linéarisé les relations doses/effets; pour cela on a cherché des transformations adéquates des données et les paramètres de la relation linéaire entre les variables transformées ont été estimés par une méthode des moindres carrés où les écarts sont pondérés en tenant compte de la variance des observations transformées.

TABLEAU 3

*Possibilités de variations, à l'alvéographe, offertes par l'utilisation de la CSH et/ou de l'AA*

| | Conditions | W | L | P |
|---|---|---|---|---|
| Produits séparés . . | CSH < 170 nM . . . . . | ↘ | ↗ | ↘ |
| | CSH > 170 nM . . . . . | ↘ | ↘ | ↘ |
| | AA . . . . . | ↗ | → | ↗ |
| Mélanges . . . . | $\frac{(CSH)^2}{AA} = \left(\frac{k_1}{k_2}\right)^2$ . . . . . | $W_0$ | L↗ | *f* (doses) |
| | $AA > CSH^2 . \left(\frac{k_2}{k_1}\right)^2$ . . . . . | W↗ | L↗ | « |
| | $AA < CSH^2 . \left(\frac{k_2}{k_1}\right)^2$ . . . . . | W↘ | L↗ | « |

En prenant comme référence :

$$W = W_0 + k_1 \sqrt{AA} - k_2 . CSH$$

*Évolution de $P_2$ et P*

L'action de l'AA se traduit par la seule augmentation de la CA. La tendance asymptotique de cette évolution suggère une saturation possible des sites accessibles. L'invariabilité de la constante de relaxation a été vérifiée en calculant les régressions $P_2 = f(1/t)$ et en effectuant un test de parallélisme.

L'action de la CSH seule provoque une diminution de la CA proportionnelle à la racine carrée des quantités ajoutées lorsque celles-ci sont supérieures ou égales à 28 nM, ainsi qu'une diminution directement proportionnelle de la CR. Celle-ci devient nulle pour environ 165 nM de CSH (quantité extrapolée des estimations obtenues à la suite du test de parallélisme). Sous l'action d'un mélange de ces deux produits, l'évolution des paramètres caractéristiques des transformées est la suivante :

- la constante de relaxation correspond à l'action de la CSH seule;
- la contrainte asymptotique peut être considérée, pour des quantités comprises entre 57 et 341 nM, comme résultant de l'action opposée des deux produits, puisqu'un modèle additif simple en permet une bonne représentation ($r = 0{,}977$ pour 16 données).

On obtient, par l'emploi d'une transformation différente (racine carrée au lieu de l'inverse) pour l'acide ascorbique, un modèle additif satisfaisant de l'ensemble des données ($r = 0{,}967$ pour 25 données).

*Évolution de L*

L'analyse de variance n'ayant pas permis de mettre en évidence une action de l'acide ascorbique et permettant de conclure à un effet faible du temps, nous avons considéré les mélanges le contenant comme des répétitions. Il est remarquable que cette conclusion ponctuelle ne confirme pas la diminution habituellement constatée par d'autres (LAUNAY *et coll.* 1976).

La représentation graphique de $L^2 = f$ (CSH) donne une linéarisation satisfaisante de la relation doses/effets. Pour les quantités de réducteur inférieures à 228 nM, on observe une relation directement proportionnelle.

Le maximum d'extensibilité est atteint pour une dose sensiblement égale à celle permettant l'obtention d'une CR nulle. Bien que non quantifiée, l'interaction de ces deux produits est illustrée par la figure 3.

La présence d'une quantité même faible d'acide ascorbique se traduit par une action plus progressive du réducteur (l'effet maximum ne semblant être atteint que vers 340 nM de CSH).

La présence de quantités plus fortes d'AA (de 114 à 341 nM) amplifie ce phénomène.

*Évolution de W*

Le choix des transformations des variables explicatives nécessaires à la linéarisation du modèle d'action des mélanges a été fait sur les produits seuls.

La CSH provoque une diminution directement proportionnelle, alors que l'augmentation résultant de l'action de l'AA est proportionnelle à la racine carrée des quantités d'oxydant.

Bien que ne tenant pas compte de l'interaction constatée en III. 2 —, celle-ci étant faible, le modèle additif permet néanmoins une bonne description des valeurs expérimentales enregistrées ($r = 0{,}916$ pour 200 données).

## *Au farinographe*

### 1. — *Essais préliminaires*

Une première série d'essais a porté sur l'influence du moment d'incorporation des produits pour voir si l'incorporation des réactifs, par l'intermédiaire de l'eau de coulage ou après l'apparition du pic de la $C_M$ par « bassinage » de la pâte, influe sur les paramètres observés. Ces essais n'ont pas permis la mise en évidence de différences significatives. On a donc incorporé les réactifs par l'intermédiaire de l'eau d'hydratation.

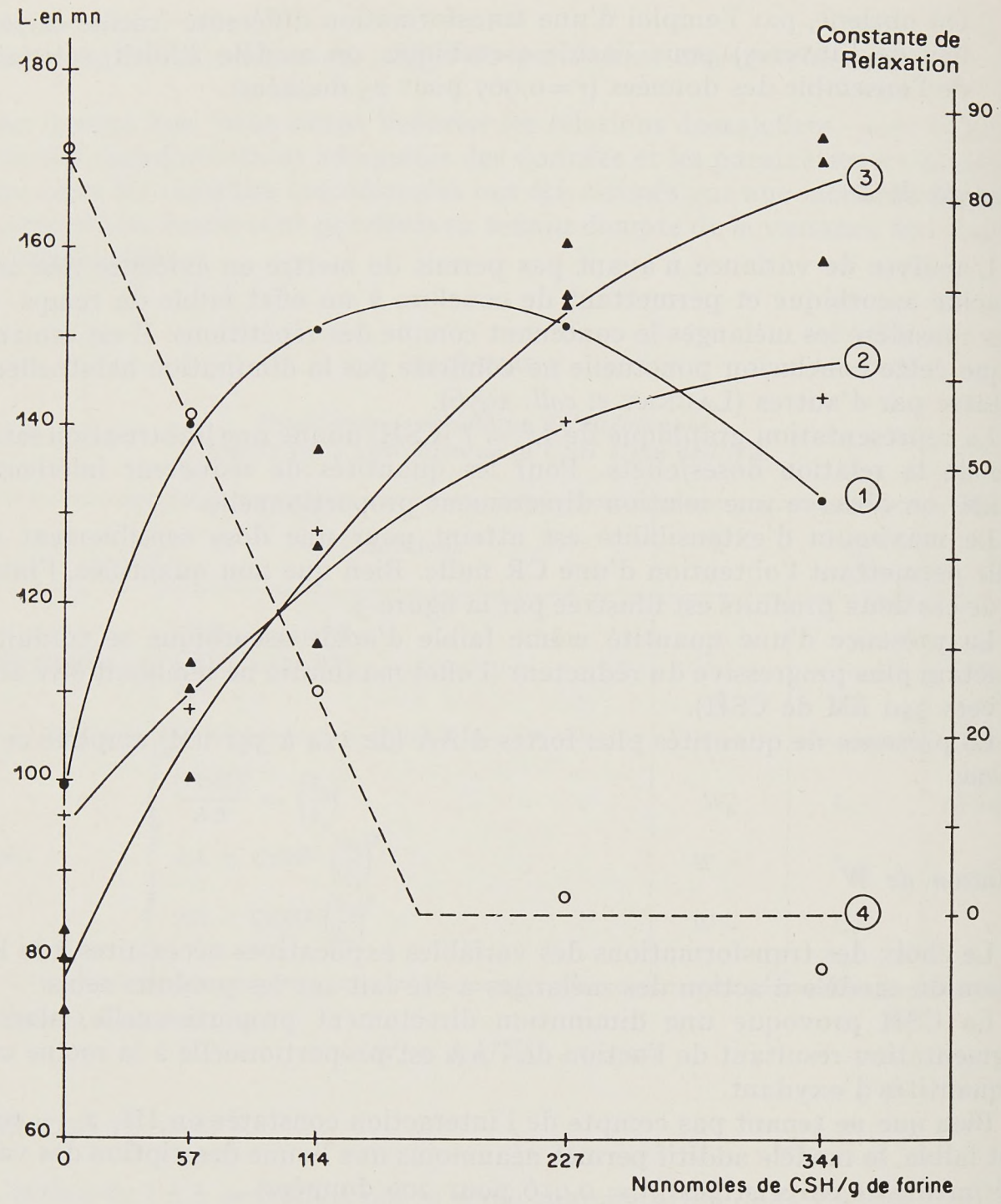



FIG. 3. — *Évolution de L et de la constante de relaxation selon* HLYNKA, *en fonction de l'adjonction de CSH.*

1. En l'absence d'AA.
2. En présence d'une faible quantité de AA (57 nM/g).
3. En présence de quantités importantes de AA (114, 227, 341 nM/g).
4. Évolution comparée de la CR.

## 2. — *Résultats obtenus avec la CSH*

- *Influence sur la consistance maximum* ($C_M$)

Aucune évolution n'a pu être observée, la moyenne obtenue étant de 510 UB (490-530).

Par contre, il y a une diminution de l'épaisseur de la courbe en ce point (90 UB pour le témoin — 60 UB pour la dose supérieure).

• *Influence sur le temps de formation* (T)

Sur cette série d'essais, aucune variation n'a été observée. Nous avons constaté une diminution de ce paramètre sur des pâtes de farine de blés américains (type DNS) dont le temps de formation dans les conditions normales est plus important (de l'ordre de 6 minutes).

• *Influence sur l'affaiblissement* ($\Delta$ 15)

Comme tout réducteur, la CSH provoque une augmentation de ce paramètre. Il est apparu (et ceci a été confirmé avec une autre farine) que la courbe doses/effets comporte deux parties (fig. 4), entre 0 et environ 380 nM, augmentation faible de $\Delta$ 15 (50 UB), au-delà évolution plus importante tendant vers un maximum (330-340 UB) dès 3 à 4 000 nM/g. La linéarisation de cette seconde partie de la courbe met en évidence, par extrapolation, une dose seuil de 165 nM.

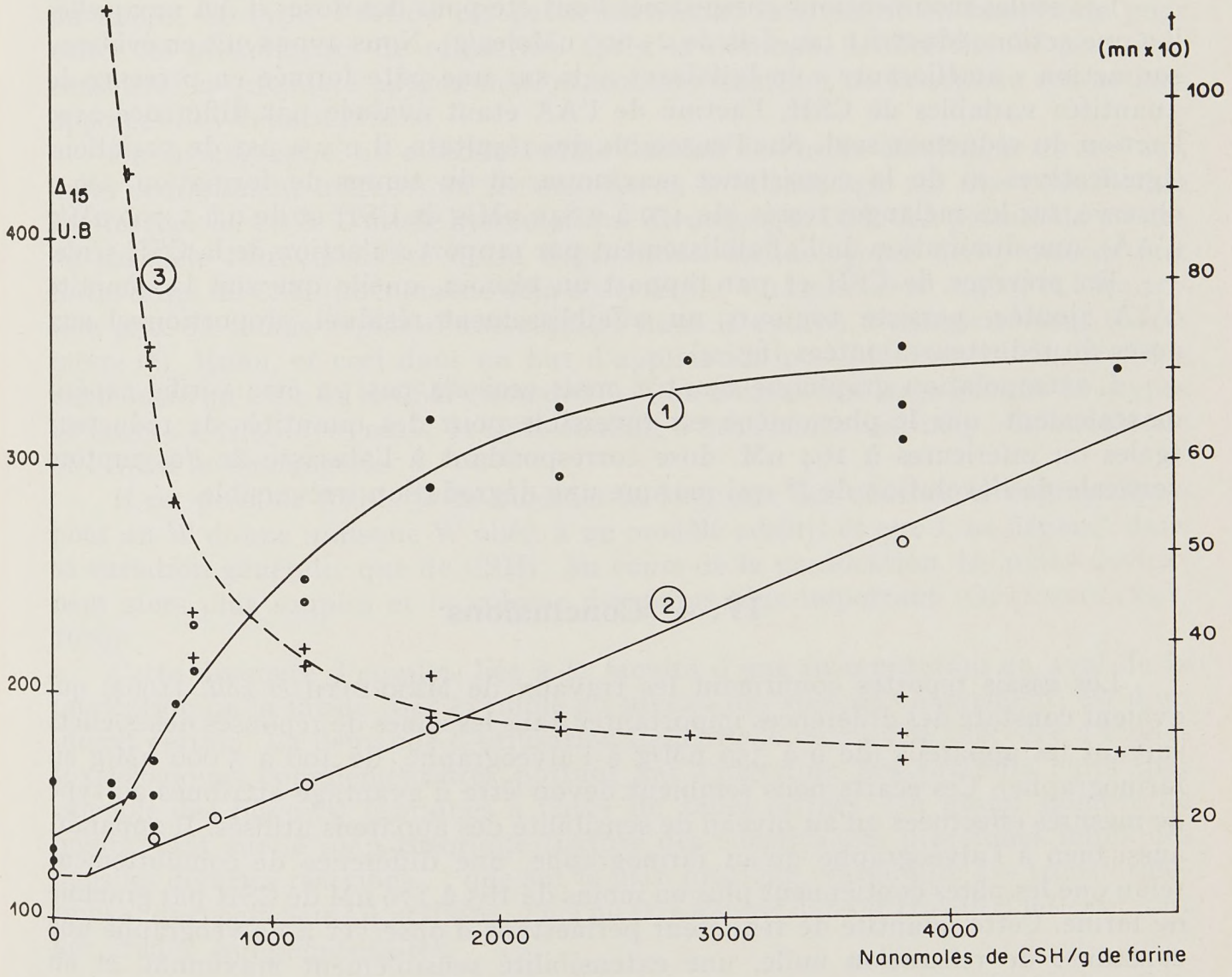



FIG. 4. — *Évolution de* $\Delta_{15}$ *et de* t* *en fonction de l'adjonction de quantités variables de CSH.*

1. En l'absence d'AA.
2. $\Delta_{15}$ minimum obtenu en présence d'AA.
3. Évolution comparée de *t**.

• *Évolution de t**.

L'apparition de cette « rupture » dans la courbe correspond à un brusque changement d'état de la pâte. Elle n'a pas été mise en évidence pour des quantités inférieures à 300 nM/g quelles que soient la durée et la vitesse du pétrissage. Il faut cependant noter que l'angle formé par les deux portions de courbe avant et après ce point étant lié à la quantité de réducteur, cette limite est difficile à préciser. Il est probable que l'asymptote observée (fig. 4) correspond sensiblement au début de la seconde partie de courbe évoquée au paragraphe précédent.

3. — *Influence de l'acide ascorbique*

Une première série d'essais effectués en ajoutant des quantités croissantes d'AA n'a pas permis d'observer des modifications significatives de la courbe (en particulier de $\Delta$ 15) malgré des essais de pétrissage à vitesses supérieures, que la pâte soit ou non en contact avec l'air atmosphérique.

Les seules modifications enregistrées l'ont été pour des doses d'AA auxquelles il a une action réductrice (au-delà de 25 000 nMoles/g). Nous avons mis en évidence son action « améliorante » en le faisant agir sur une pâte formée en présence de quantités variables de CSH, l'action de l'AA étant évaluée par différence avec l'action du réducteur seul. Sur l'ensemble des résultats, il n'y a pas de variations significatives ni de la consistance maximum, ni du temps de formation. On a observé, sur les mélanges testés (de 470 à 2 840 nM/g de CSH et de 0 à 1 700 nM/g d'AA), une diminution de l'affaiblissement par rapport à l'action de la CSH seule.

En présence de CSH et par rapport au témoin, quelle que soit la quantité d'AA ajoutée, persiste toujours un affaiblissement résiduel proportionnel aux doses de réducteur ajoutées (fig. 4).

L'extrapolation graphique montre, mais ceci n'a pas pu être vérifié expérimentalement, que le phénomène est réversible pour des quantités de réducteur égales ou inférieures à 164 nM, dose correspondant à l'abscisse de l'asymptote verticale de l'évolution de *t** qui marque une dégradation irréversible.

## IV. — Conclusions

Les essais reportés confirment les travaux de Meredith *et coll.* (1964) qui avaient constaté des différences importantes dans les zones de réponses doses/effets suivant les appareils (de 0 à 350 nM/g à l'alvéographe, de 400 à 5 000 nM/g au farinographe). Ces écarts nous semblent devoir être d'avantage attribués au type de mesures effectuées qu'au niveau de sensibilité des appareils utilisés. Il apparaît, aussi bien à l'alvéographe qu'au farinographe, une différence de comportement selon que les pâtes contiennent plus ou moins de 165 à 170 nM de CSH par gramme de farine. Cette quantité de réducteur permettant d'observer à l'alvéographe une constante de relaxation nulle, une extensibilité sensiblement maximum, et au farinographe la limite au-delà de laquelle il n'y a plus de réversibilité de l'affaiblissement par adjonction d'AA même en quantité importante (1 700 nM/g de farine).

L'A.C.P. a mis en évidence la vitesse supérieure de réaction (telle que l'on peut l'apprécier par les effets produits en un temps donné) de la CSH permettant à l'AA (ou au système oxydant qu'elle met en œuvre) d'accéder à des groupements

sulfhydriles habituellement non impliqués dans la formation des pâtes. Ces groupements, qui représentent selon Lee et Tzen-Son Lai (1969) jusqu'à 50 p. 100 des amino-acides soufrés de la gluténine, peuvent réagir directement ou par l'intermédiaire de l'AA avec d'autres molécules de gluténine ou de protéines solubles (Williams, 1975).

L'accession inhabituelle de l'AA à ces groupements soufrés et la diversité des réarrangements possibles qu'elle permet, est une explication possible de l'interaction systématique observée lors des analyses de variances.

A l'alvéographe, il a été montré que l'AA seul n'a pas d'action sensible sur la longueur de la courbe, mais que, ajouté avec la CSH, il en module les effets en permettant l'adjonction de quantités au moins deux fois plus importantes sans diminution de l'extensibilité. Une explication possible en est que la présence de quantités relativement fortes d'AA bloque les SH des protéines solubles de peu d'intérêt au niveau des propriétés d'élasticité des pâtes favorisant, par voie de conséquence, la formation de liaisons gluténines plus actives (Williams, 1975).

L'étude de relaxation montre en particulier que la CSH permet l'obtention de pâtes de constantes de relaxation nulles, c'est-à-dire n'évoluant pas en fonction du temps. Ce type d'action est particulièrement intéressant en biscuiterie pour éviter les phénomènes de rétraction après la découpe. L'effet sur W peut être considéré, en première approximation, comme résultant de la somme des actions opposées des deux additifs.

Au farinographe, on a rendu visible l'action de l'acide ascorbique et ceci aux doses couramment utilisées en technologie en le faisant agir sur une pâte formée en présence de CSH. L'étude systématique de mélanges CSH-AA permet de mettre en parallèle l'irréversibilité de la dégradation technologique des protéines aux fortes doses de CSH (phénomène déjà observé par Villegas *et al.* 1963) et l'apparition plus ou moins rapide d'une rupture dans la courbe d'enregistrement (paramètre $t^*$). Enfin, et ceci dans un but d'application possible dans l'industrie, il a été montré qu'avec de la CSH et/ou de l'AA, on obtient une large gamme de « types de farines ». Employés seuls, la CSH conduit à des farines destinées à la biscuiterie et l'AA à la boulangerie.

Il est possible (tabl. 3) de modifier la longueur des courbes alvéographiques pour un W donné (puisque W obéit à un modèle additif et que L ne dépend, dans sa variation générale, que de CSH). Au cours de la panification, les pâtes deviennent alors plus souples et le volume des pains plus important (Grandvoinnet, 1979).

Cette diversité d'emploi, liée à la faculté d'une incorporation en aval de la fabrication de la farine (par exemple au niveau des silos de chargement) est d'un intérêt certain. La demande d'utilisation industrielle devra être précédée d'études toxicologiques complémentaires portant sur l'ingestion des produits cuits (par exemple des biscuits) fabriqués à l'aide de telles farines. Un grand nombre de points, tant sur le plan théorique (nature des constituants protéiques impliqués dans les diverses réactions...) que sur le plan pratique (variabilité des transformations et des coefficients d'activité...) n'a pu être abordé dans ce travail et nécessiterait des études complémentaires.

*Reçu pour publication en octobre 1979.*

## Remerciements

Nous remercions MM. TOMASSONE et RODOLPHE du Service de Biométrie de l'I.N.R.A. (Jouy-en-Josas) et M. TRANCHEFORT et Mme BEAUX du Service Statistique de L'I.T.C.F. à Boigneville pour l'aide qu'ils nous ont apportée.

## Summary

*Appreciation of ascorbic acid and cysteine chlorhydrate effects on the rheological properties of wheat flour doughs with the alveograph and the farinograph*

The study deals with the effects of cysteine chlorhydrate (CSH) and/or ascorbic acid (AA) added to dough.

With the alveograph and the farinograph, a quantity of CSH has been determined beyond which the effects of the reducing agent are no more reversible, whatever the ascorbic acid quantities we add.

With the alveograph, if there is no oxydant, this limitating dose is the one which permits to observe a zero relaxation constant and a maximum lengthening; and on the farinographs the appearance of a specific distortion.

It has also been shown that a moderate addition of these products, used separately or mixed, to wheat flour allows to obtain flours which theoretically are proper to biscuitmaking or ruskmaking processes.

## Références bibliographiques

CALVEL R., 1968. L'influence de l'acide ascorbique sur les pâtes fermentées. *B.E.F.M.*, **225**, 117-124.

BLOKSMA A. H., 1971. Rheology and Chemistry of dough. In « Wheat » 2nd edition. Publié par l'A.A.C.C. St Paul, Minnesota.

BLOKSMA A. H., 1975. Thiol and disulphide groups in dough rheology. *Cereal chemistry*, **52**, 170 r-183 r.

FEILLET P., 1965. Rôle des groupements thiols et disulfures dans les propriétés rhéologiques des pâtes. *Meunerie Française*, 15-34.

GUILLEMET R., SONNTAG G., 1943. L'action des oxydants et des réducteurs sur les protéides de la farine de blé. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **216**, 420-422.

GUILLEMET R., HAEGEL J., 1944. L'action des oxydants et des réducteurs sur les protéides de la farine de blé dans ses rapports avec la panification. *C.R. Acad. Agr.*, **30**, 42-43.

GRANDVOINNET P., 1979. Action des réducteurs et des oxydants dans les produits de cuisson à base de céréales (à paraître). *Ann. Technol. Agric.*

HLYNKA I., BARTH F. W., 1955. Chopin alveograph studies. II Structural relaxation in dough. *Cereal Chem.*, **32**, 472-480.

LAUNAY B. *et coll.*, 1978. Influence de la composition, du pétrissage et du repos sur la destruction des pigments caroténoïdes et les propriétés viscoélastiques des pâtes de farine de blé tendre. *Bulletin E.N.S.M.I.C.*, **287**, 247-287.

LEE C. C., TZEN-SON LAI, 1969. Studies with radioactive tracers. XV Some observations on the sulfhydryl groups in dough. *Cereal Chem.*, **46**, 598-606.

MEREDITH P., HLYNKA I., 1964. The action of reducing agents on dough *Cereal Chem.*, **41**, 285-299.

SCHWARTZ-TIENE E., 1957. Alterazioni funzionali e anatomiche renali nella intossicazione sperimentale da cistina. *Minerva Pediatrica*, **9**, 231-238.

VILLEGAS E., POMERANZ Y., SHELLENBERGER J. A., 1963. Effects of thiolated gelatins and glutathione on rheological properties of wheat doughs. *Cereal Chem.*, **40**, 674-703.

WILLIAMS A., 1975. Breadmaking: the modern revolution, 43-71, Hutchinson Benham, London.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (3) 287-297.

# Action de réducteur et d'oxydant dans les produits de cuisson à base de farine de blé

P. GRANDVOINNET et M. BERGER

*Laboratoire de Recherches des Grands Moulins de Pantin*
*62, rue du Louvre, 75002 Paris*

## Résumé

L'action de la cystéine et de l'acide ascorbique a été étudiée en panification française (pétrissage lent, pétrissage intensifié, pains riches en gluten), en biscotterie et en biscuiterie. Les essais technologiques ont permis de suivre le comportement des pâtes, l'évolution du volume ou des dimensions des produits selon les doses de réducteur, d'oxydant ou de leur mélange. Des doses optimum d'emploi ont été définies. Il apparaît que le degré de collant des pâtes est un facteur limitant. Les gains de volumes obtenus en panification française ou biscottière doivent permettre de raccourcir les temps de fermentation, l'affaiblissement des pâtes biscuitières d'employer des farines de qualité courante, à condition de modifier certains réglages.

Mots-clés : *Cystéine ; Acide ascorbique ; Panification française ; Biscottes-Biscuits.*

## I. — Introduction

L'action des réducteurs dans les pâtes destinées à la panification a été étudiée par de nombreux auteurs.

L'effet dépressif de ces produits sur la qualité des pâtes et le volume des pains a ainsi été mis en évidence (GEDDES, 1930). Mais OFELT et LARMOUR (1940), SWANSON et ANDREWS (1946) observent l'action conjuguée et améliorante des réducteurs et oxydants sur le comportement des pâtes et la qualité du pain. HENIKA et ROGDERS (1955) définissent les conditions optimum d'une panification rapide en présence de cystéine et de bromate et obtiennent des pains cuits en moule avec 80 ppm de cystéine, 4 p. 100 de petit lait et 50/60 ppm de bromate de potassium, dont les volumes et la mie sont excellents, en diminuant le temps de pétrissage et sans première fermentation. Pour TSEN (1969), la cystéine exerce

son action réductrice sur les protéines de la pâte immédiatement au cours du pétrissage, alors que le bromate oxyde les groupements SH des protéines de la pâte très lentement, jusqu'au tout début de la cuisson. Selon KILBORN et TIPLPES (1973), la cystéine n'a pas d'action propre au cours de la fermentation de la pâte : ces auteurs pensent que les agents réducteurs produisent une accélération des réactions chimiques lors de la formation et de l'évolution de la pâte. MOSS (1974, 1975) précise l'action de la cystéine et des oxydants en étudiant la microstructure de la pâte et de la mie. Depuis cette date, l'emploi des réducteurs au niveau industriel a fait l'objet de nombreuses mentions.

En France, les travaux de GUILLEMET, SONNTAG (1943) ; GUILLEMET, HAEGEL (1944) ont surtout insisté sur leur action néfaste en panification.

Depuis ces travaux, les données du problème ont évolué. La qualité des farines panifiables, dans notre pays, s'est améliorée à la suite des progrès de la sélection, du classement des blés par les organismes stockeurs et des possibilités de choix offertes aux meuniers, par suite d'une production de blés largement excédentaire par rapport à leurs besoins. En panification, les pâtes obtenues avec ces farines n'exigent pas l'emploi de réducteurs pour être assouplies, mais constituent un substrat suffisamment résistant pour supporter leur action. Cette augmentation de la force boulangère des farines rend difficile l'approvisionnement du moulin en blés faibles pouvant convenir aux farines biscuitières. L'action dépressive des réducteurs peut alors devenir une nécessité. Par ailleurs, l'introduction du pétrissage accentué rapproche les pâtes de celles des pays anglo-saxons : présence légale d'acide ascorbique qui joue le rôle d'agent oxydant, oxygénation de la pâte par un brassage important. D'où l'intérêt de mener les recherches sur l'utilisation des réducteurs dans les industries de cuisson à base de céréales. Dans un premier temps ont été réalisées les études de laboratoire avec l'alvéographe Chopin et le farinographe de Brabender (BERGER, GRANDVOINNET : à paraître). On rapporte maintenant les résultats des essais de panification et biscuiterie.

## II. — Matériel et méthodes

### 1. — *Matériel*

1.1. — Des farines de force boulangère variable ont été utilisées selon les produits fabriqués : farines de type 55 de force boulangère exprimée par la valeur du W comprise entre 85 et 180. Dans le cas de pain au gluten, du gluten vital (fourni par les Établissements Roquette) a été ajouté à une farine de force boulangère moyenne en quantités variables.

1.2. — Le chlorhydrate de cystéine (CSH) a été employé comme agent réducteur ; il a été ajouté en début de pétrissage. Les doses sont exprimées en partie par million (ppm) de CSH par rapport à la farine mise en œuvre.

### 2. — *Méthodes*

2.1. *Panification type pain français*

*Pétrissage lent*

Formule : exprimée par rapport à la farine telle quelle, la formule de la pâte est la suivante : farine 100 — eau 60 — sel 2 — levure 1,5.

Pétrissage : pétrin Artofex PH 005, 10 minutes à 40 brassées par minute,
Fermentation : A = pointage 2 h 45 mn. Apprêt 45 mn.
B = pointage 3 h. Apprêt 1 h.
C = pointage 3 h 15 mn. Apprêt 1 h 15 mn.

*Pétrissage rapide*

Formule : exprimée par rapport à la farine telle quelle, la formule de la pâte est la suivante : farine 100; eau 60; levure 3; sel 2,5; acide ascorbique 0,002 pour le témoin, de 0 à 0,003 pour les autres essais.

Pétrissage : pétrin Artofex PH 005, 5 minutes à 40 brassées par minute puis 15 minutes à 80 brassées par minute.

Fermentation : pointage 40 minutes — apprêt 2 heures.

Les pâtes obtenues selon l'un et l'autre type de pétrissage sont découpées et façonnées en pâtons de 350 grammes donnant, après cuisson (20 minutes à 240 °C) des pains dits batards de 280 grammes en moyenne. Le volume des pains obtenus avec le pétrissage rapide de la pâte est plus élevé qu'avec le pétrissage lent.

### 2.2. *Panification type pain au gluten*

Formule : exprimée par rapport au mélange farine + gluten tel quel, la formule de la pâte est la suivante : (farine + gluten) 100; eau variable; sel 1,5; levure 5.

Pétrissage : pétrin Artofex PH 005, 20 minutes à 80 brassées par minute.

Fermentation : pointage 15 minutes — apprêt 1 heure.

Les pâtes obtenues sont détaillées et façonnées en pâtons de 350 grammes de pâte cuits sur sole pendant 20 minutes à 240 °C.

### 2.3. *Essais biscottiers*

Ils ont été effectués selon le test mis au point par Battail et Gerard (1966).

Formule : exprimée par rapport à la farine telle quelle, la formule de la pâte est la suivante : farine 100; eau 50; levure 5; sucre 5; matières grasses 0 à 10 (témoin 5); acide ascorbique 0 à 0,002.

Pétrissage : pétrin Artofex PH 005, 25 minutes à 40 brassées par minute.

Fermentation : pointage 20 minutes; apprêt 45 minutes.

Cuisson en moules ouverts de pâtons de 500 grammes (25 minutes à 250 °C).

Des essais de répétabilité préliminaires ont montré que les différences entre les volumes des pains suivantes sont statistiquement significatives :

| | |
|---|---|
| pétrissage lent | 40 ml |
| pétrissage accentué | 50 ml |
| pain au gluten et pain biscotte | 60 ml |

### 2.4. *Essais biscuitiers*

Ils ont été effectués selon le test type petit beurre mis au point par la Guerrivière, Benoualid, Seince (1971).

Formule : exprimée par rapport à la matière sèche de la farine, la formule de la pâte est la suivante : farine 100; eau 38; sucre 30; matières grasses 15; sel 0,5; bicarbonate de sodium 0,3; sesquicarbonate 0,3; phosphate aluminosodique 0,02. Un creaming est préparé avec le sucre, les matières grasses, le sel et une partie de l'eau.

Pétrissage : pétrin du farinographe de Brabender, muni d'un couvercle spécial. Frasage de la farine et du creaming 1 minute; adjonction de l'eau; pétrissage sans couvercle 3 minutes. Mise en place du couvercle et prétrissage de 13 minutes.

Repos de la pâte : 3 heures à 20 °C.

Laminage et découpage : la pâte est comprimée dans un calibre, repose pendant 2 minutes puis est laminée 3 fois dans le même sens (épaisseurs 4,55 mm, 2,15 mm, 1,20 mm). 12 pâtons circulaires sont découpés avec un emporte-pièce.

Cuisson : 6 minutes à 290 °C dans le four Chopin MGC.

Les mesures sont effectuées sur les 12 biscuits; le résultat moyen est calculé ensuite. On mesure l'épaisseur, le grand et le petit diamètres (L, e) des biscuits. On calcule le volume théorique et la densité théorique d'un biscuit.

Au cours des essais, une attention particulière a été portée au comportement des pâtes, au volume des pains ou aux dimensions des biscuits.

## III. — Résultats et discussion

### 1. — *Panification type pain français*

#### 1.1. *Cas du pétrissage lent*

Cette technique de panification est très peu usitée en France. Les essais effectués ne l'ont été que sur une seule farine (W = 180). Ils sont rapportés pour

TABLEAU I

*Volumes des pains obtenus en pétrissage lent pour différents temps de fermentation et des quantités croissantes de cystéine (pâtons de 350 g de pâte)*

| Pointage<br>Apprêt | 2 h 45 mn<br>0 h 45 mn | 3 h<br>1 h | 3 h 15 mn<br>1 h 15 mn |
|---|---|---|---|
| Cystéine (en ppm) | Volume en ml | | |
| 0 | 1 295 | 1 305 * | 1 310 |
| 25 | 1 355 | 1 380 | 1 410 |
| 50 | 1 360 | 1 410 | 1 415 |
| 75 | 1 330 | 1 340 | 1 380 |
| 125 | 1 250 | 1 295 | 1 320 |
| 175 | 1 230 | 1 235 | 1 275 |
| 250 | 1 110 | 1 150 | 1 195 |

(*) Témoin.

montrer la différence existant entre les résultats obtenus avec ce type de pétrissage et ceux obtenus avec le pétrissage accentué, plus couramment employé (tabl. 1).

Des quantités de 25 à 250 ppm de CSH ont été ajoutées à la pâte. Au fur et à mesure de l'augmentation de la dose de réducteur, les pâtes cessent d'abord d'être élastiques puis deviennent extensibles et enfin collantes à partir de 50 ppm. Les pains ont un aspect satisfaisant (développement, jets des coups de lames), tant que la pâte n'est pas exagérement collante. La coloration de la croûte n'apparaît pas différente de celle de la croûte des témoins. Quel que soit le temps de fermentation, le volume des pains augmente pour de faibles adjonctions de CSH (0 à 50 ppm), puis diminue linéairement.

Le volume redevient égal à celui du témoin pour des doses de CSH d'autant plus élevées que le temps de fermentation est plus long (90-110-140 ppm).

L'adjonction optimale de CSH pour l'ensemble de la panification, avec la farine utilisée, est de 50 ppm. Elle correspond à la dose au-delà de laquelle la pâte devient collante et plus difficile à manier. Elle permet d'obtenir des pains de volume équivalent à celui du témoin, tout en abrégeant la fermentation. S'il peut être généralisé, cet aspect des résultats est intéressant sur la plan pratique et économique.

### 1.2. *Cas du pétrissage rapide*

La panification en pétrissage rapide (ou pétrissage accentué) nécessite l'addition d'acide ascorbique à la pâte en quantité variable selon les farines et les diagrammes de panification.

Avec la même farine que pour le pétrissage lent, les essais ont été menés en faisant varier les doses d'acide ascorbique et de CSH, leur introduction se faisant au début du pétrissage. Aucune des pâtes, lorsqu'elle contenait de l'acide ascorbique, n'a présenté le caractère collant, quelles que soient les quantités de CSH ajoutées. Selon les quantités d'acide ascorbique, l'action du CSH sur le volume est différente (tabl. 2).

TABLEAU 2

*Volume des pains obtenus en pétrissage accentué pour des quantités croissantes de cystéine en présence d'acide ascorbique (pâtons de 350 g de pâte)*

| Cystéine (en ppm) / Acide ascorbique | 0 ppm | 5 ppm | 10 ppm | 20 ppm | 30 ppm |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 1 610 | 1 725 | 1 750 | 1 750 * | 1 750 |
| 50 | 1 580 | 1 725 | 1 755 | 1 805 | 1 855 |
| 100 | 1 405 | 1 575 | 1 705 | 1 710 | 1 790 |
| 150 | 1 285 | 1 490 | 1 570 | 1 580 | 1 695 |
| 200 | — | — | — | 1 490 | — |

(*) Témoin.

Sans acide ascorbique, le volume des pains diminue lorsque la teneur en cystéine augmente. La diminution est plus rapide au-delà de 50 ppm de CSH. Ce résultat, différent de celui obtenu en pétrissage lent, traduirait l'action plus énergique du pétrissage accentué venant s'ajouter à celle du CSH sur le réseau glutineux.

En présence d'acide ascorbique (5 et 10 ppm) et de CSH (0 et 50 ppm), le volume des pains est identique au volume du témoin.

Pour les mêmes doses de CSH, mais avec 20 et 30 ppm d'acide ascorbique, le volume des pains augmente d'autant plus que la quantité d'acide ascorbique est plus grande.

Par contre, lorsque CSH dépasse 50 ppm, le volume des pains décroît linéairement avec l'augmentation de la quantité de CSH. Les droites d'évolution du volume des pains, pour des doses croissantes de CSH et différentes quantités d'acide ascorbique, sont approximativement parallèles.

Le volume des pains, en fonction de l'adjonction de CSH et d'acide ascorbique, dépend de plusieurs facteurs.

Le moment d'incorporation de l'acide ascorbique dans une pâte à laquelle est ajouté du CSH au début du pétrissage, n'a d'influence sur le volume que si la pâte n'a pas été trop dégradée. Au-delà d'une certaine dose d'incorporation de CSH, l'adjonction d'acide ascorbique ne permet pas d'améliorer le volume initial ou de le retrouver (tabl. 3).

TABLEAU 3

*Volume des pains obtenus en pétrissage accentué pour des quantités variables de cystéine, l'acide ascorbique étant ajouté à différents moments du pétrissage (patons de 350 g de pâte)*

| Cystéine ppm | Acide ascorbique ppm | Moment d'adjonction | Volume | |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 20 | temps : 0 | 1 780 | 1 |
| | | + 10 minutes. | 1 800 | |
| | | + 15 minutes. | 1 770 | |
| 50 | 20 | temps : 0 | 1 825 | 1 |
| | | + 10 minutes. | 1 840 | |
| | | + 15 minutes. | 1 800 | |
| 100 | 20 | temps : 0 | 1 585 | 2 |
| | | + 10 minutes | 1 530 | |
| | | + 15 minutes | 1 510 | |

1 : Différences de volumes non significatives.
2 : Différences de volumes significatives.

La force initiale de la farine a une grande importance.

Avec la même dose d'acide ascorbique et avec la farine la plus forte, de faibles quantités de CSH permettent, comme décrit plus haut, une augmentation du volume des pains. Le volume reste semblable à celui du témoin avec une farine de force moyenne. Il diminue avec une farine faible même aux plus faibles quantités de CSH (fig. 1).

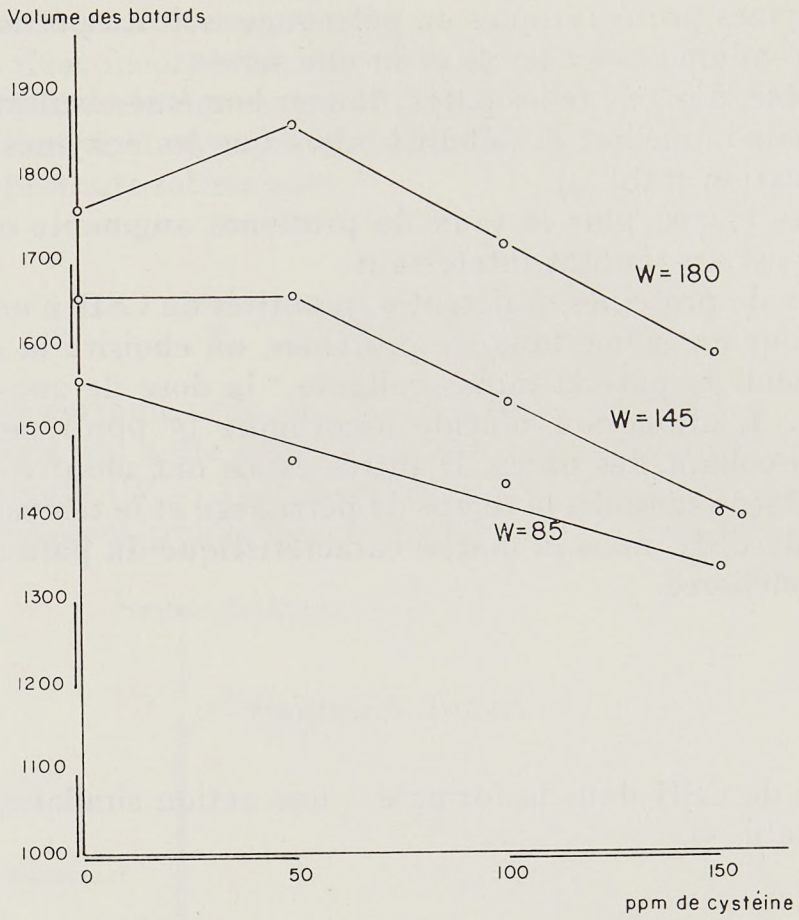



FIG. 1. — *Évolution du volume des pains obtenus par pétrissage accentué de pâtes de farines de forces différentes, pour des quantités variables de cystéine et 20 ppm (rapportées à la farine) d'acide ascorbique.*

## 2. — *Panification type pain au gluten*

Les résultats obtenus sans acide ascorbique et avec du CSH trouvent une application directe dans la fabrication de pains au gluten. Ces pains sont obtenus avec des farines enrichies par du gluten vital. Les pâtes ont trop de force et sont très difficiles à travailler. Elles demandent un diagramme particulier de fabrication comportant soit la préparation à l'avance d'une détrempe (gluten + eau), soit une

TABLEAU 4

*Volumes des pains obtenus sur sole avec des farines supplémentées en gluten, en présence de cystéine. Panification accentuée sans acide ascorbique (pâtons de 350 g de pâtes)*

| Cystéine (en ppm) — Taux de protéines N × 5,7 | 23 pour cent | 29 pour cent | 35 pour cent | 41 pour cent |
|---|---|---|---|---|
| 150 | 1 915 | 1 977 | 2 043 | 2 116 |
| 200 | 1 960 | 1 999 | 2 074 | 2 118 |
| 250 | 1 902 | 2 016 | 2 107 | 2 093 |

adjonction d'enzymes protéolytiques au pétrissage, soit un pétrissage très intense. Les pains ont un volume assez faible et la mie serrée.

Le CSH semble, dans de telles pâtes, donner le même résultat que les enzymes protéolytiques mais immédiat et définitif, alors que les enzymes agissent tout au long de la panification (tabl. 4).

Au cours des essais, plus le taux de protéines augmente et plus le volume augmente, ce qui est un résultat intéressant.

A même taux de protéines, différentes quantités de CSH n'ont pas d'influence sur le volume. Pour un même taux de protéines, on choisira la quantité de CSH qui permet d'obtenir la pâte la moins collante : la dose de 200 ppm de cystéine semble optimum. L'adjonction d'acide ascorbique (5 ppm) permet de corriger l'inconvénient du collant des pâtes. D'autres essais ont montré qu'il est possible de raccourcir, de façon notable, le temps de pétrissage et le temps de fermentation, par l'adjonction de CSH, mais la mâche caractéristique du pain au gluten n'a été que faiblement améliorée.

### 3. — *Essais biscottiers*

L'adjonction de CSH dans la formule a une action similaire à celle qu'elle a en panification (tabl. 5).

TABLEAU 5

*Volumes des pains biscottes obtenus avec différentes quantités de matières grasses, d'acide ascorbique, de cystéine (pour 500 g de pâte)*

| (*) | 0 pour cent | | 2,5 pour cent | | 5,0 pour cent | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Acide ascorbique | 0 ppm | 20 ppm | 0 ppm | 20 ppm | 0 ppm | 20 ppm |
| Cystéine (en ppm) : | | | | | | |
| 0 | 1 730 | 2 020 | 2 015 | 2 170 | 1 980 | 2 125 |
| 25 | 1 695 | 2 055 | 1 940 | 2 195 | 1 195 | 2 165 |
| 50 | 1 660 | 2 105 | 1 880 | 2 245 | 1 840 | 2 195 |
| 75 | 1 610 | 2 020 | 1 805 | 2 165 | 1 780 | 2 105 |
| 150 | 1 500 | 1 765 | 1 625 | 2 010 | 1 535 | 1 980 |

(*) Matières grasses telles quelles dans la formule.

Les essais sans matières grasses rendent compte de l'effet formule de fabrication. En l'absence d'acide ascorbique, le volume des pains diminue linéairement lorsque la dose de CSH augmente. La pente des droites de régression croît avec le taux de matières grasses.

L'affaiblissement de la cohésion du réseau glutineux est aggravé par l'action des corps gras. En présence d'acide ascorbique (20 ppm), il y a augmentation du volume du pain pour les faibles doses de CSH, suivie, au-delà de 50 ppm de CSH, d'une diminution semblable à celle constatée en panification française.

Cette diminution est moins rapide dans ce cas, en présence de matières grasses quelle que soit la dose incorporée. Peut-être les corps gras ont-ils un rôle émulsifiant ? Ces résultats devraient permettre d'obtenir des produits de volumes normaux avec une diminution du temps de fermentation, le grillage des tranches de pain ayant donné des produits satisfaisants.

### 4. — *Essais biscuitiers*

Au-delà d'une certaine dose, le CSH diminue la force boulangère des farines. C'est cette propriété qui a été utilisée dans le cadre d'essais biscuitiers.

A une farine forte (W = 180), a été ajouté du CSH (de 0 à 670 ppm). Le rapport L/l est inversement proportionnel à la dose de CSH ajoutée.

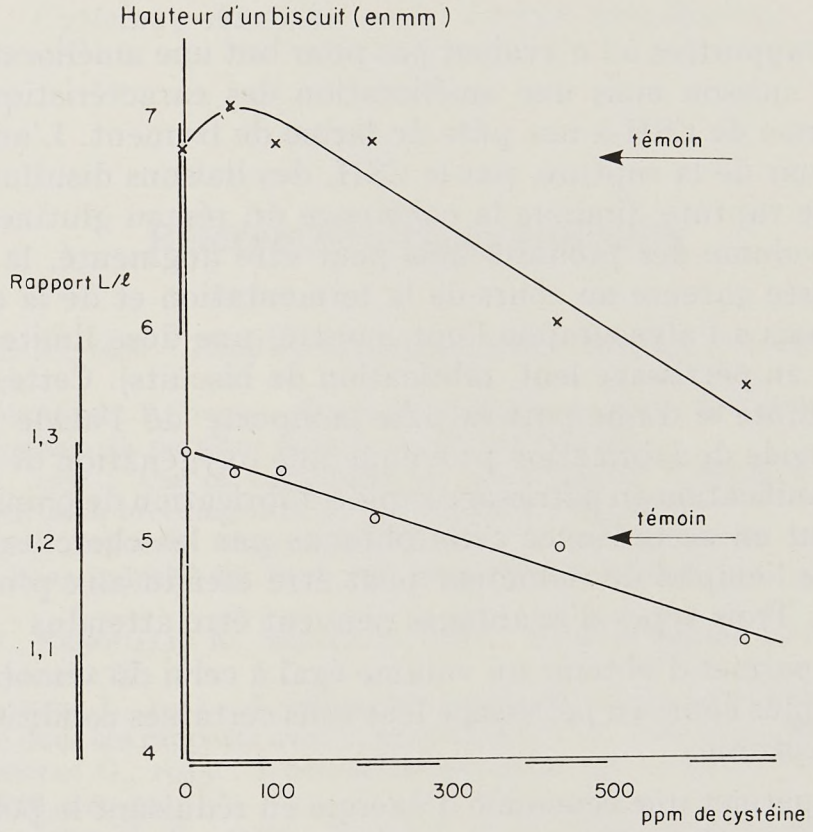



FIG. 2. — *Évolution de la hauteur* (×) et du rapport d'ovalisation *L/l* (o) *d'un biscuit pour différentes quantités de cystéine.*

Il y a diminution progressive de l'ovalisation du biscuit due à la trop grande force de la farine. La figure 2 montre que pour 300 ppm de CSH, ce rapport est approximativement égal à celui d'un biscuit obtenu avec une farine adaptée à la biscuiterie.

L'épaisseur du biscuit évolue en fonction des doses de CSH. Pour les faibles doses, elle augmente légèrement. Après un maximum entre 50 et 75 ppm, l'épaisseur du biscuit décroît. A 300 ppm, elle n'est que de 94 p. 100 de l'épaisseur du biscuit témoin. Cette perte d'épaisseur, sans doute consécutive à l'affaiblissement de la structure du réseau glutineux qui résiste mal à la poussée gazeuse, est préjudiciable à la qualité du produit.

Il est possible d'éviter la perte d'épaisseur de la pâte du biscuit par un réglage différent de l'écartement des cylindres de laminage. Pour une dose particulière

de CSH, l'épaisseur du biscuit augmente linéairement lorsque croît l'écartement des cylindres au dernier laminage, cependant que le rapport L/l diminue. La modification du procédé permet aussi de retrouver un poids, un volume, une densité de biscuit égaux à ceux du témoin. Le produit fini a un meilleur aspect de surface et une friabilité satisfaisante.

Des essais complémentaires ont montré que la pâte contenant du CSH se rétracte peu ou même ne se rétracte pas (en terme de métier prend peu ou ne prend pas de force) suivant la dose, au cours du repos avant cuisson. Cela permet d'envisager le réemploi des découpes de pâte dans les pétrissées suivantes et conduit à une économie de matières premières sans difficultés de fabrication.

## IV. — Conclusion

Les études rapportées ici n'avaient pas pour but une amélioration de la qualité des produits de cuisson mais une amélioration des caractéristiques des produits finis par adjonction de CSH à une pâte de farine de froment. L'amélioration constatée doit provenir de la rupture, par le CSH, des liaisons disulfures des protéines de la pâte. Cette rupture diminue la cohérence du réseau glutineux et l'élasticité de la pâte. Le volume des produits finis peut être augmenté, la pâte se prêtant mieux à la poussée gazeuse au cours de la fermentation et de la cuisson. Il existe pourtant (les essais à l'alvéographe l'ont montré) une dose limite à ne pas dépasser (panification en pétrissage lent, fabrication de biscuits). Cette dose limite peut être plus importante si d'une part la pâte comporte de l'acide ascorbique et si d'autre part le mode de fabrication provoque une oxygénation de la pâte au cours du pétrissage (panification en pétrissage rapide, fabrication de pains pour biscottes). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par les chercheurs anglo-saxons. Ils montrent que l'emploi de réducteur peut être étendu aux produits de cuisson de type français. Trois types d'avantages peuvent être attendus :

1° Le CSH permet d'obtenir un volume égal à celui du témoin pour un temps de fermentation plus court en pétrissage lent sous certaines conditions en pétrissage rapide, et en biscotterie.

2° Le CSH permet une économie d'énergie en réduisant le pétrissage de pâtes trop fortes (pains au gluten).

3° Le CSH permet de diminuer la trop grande force des farines en biscuiterie, ce qui autorise l'emploi de blés courants.

Il n'a pas été fait d'études toxicologiques à partir de produits ayant été obtenus en incorporant du CSH mais les doses nécessaires sont très largement inférieures à celles entraînant des troubles quelconques (Frape *et al.*, 1971).

*Reçu pour publication en octobre 1979.*

## Summary

*Effects of reducing agent and oxydant on bakery products*

The action of cysteine and ascorbic acid has been studied in french breadmaking (low speed mixing, high speed mixing, gluten bread), ruskmaking and biscuitmaking processes. The dough appearance, the evolution of the swelling volume, the size of the goods, which depend on the reducing agent and oxidant (or their mixing) proportions, have been observed through many technological tests. Optimum using quantities have been determined. It appears that the sticky aspect of dough is a limiting factor. The high volumes obtained with the french breadmaking and ruskmaking processes permit to shorten the proofing times and the biscuit dough weakening to use common wheat flour providing that one modifies some adjustements.


Key-words : *Cysteine; Ascorbic acid; French breadmaking process; Rusks; Biscuits.*

## Références bibliographiques


Battail J., Gerard R., 1966. Essai de cuisson biscottier. Principe et perspectives. *Ind. Alim. Agric.*, **83,** 565-571.

Berger M., Grandvoinnet P., 1979. Étude en rhéologie pratique de l'action de l'acide ascorbique et de la cystéine (à paraître dans la revue des I.A.A.).

Frape D. L. *et al.*, 1971. Use of L-Cystéine in bread baking. Results of a multigeneration feeding experement with breeding rats. *J. Sci. Fd Agric.*, **22,** 65-68.

Geddes W. F., 1930. Influence of germ constituents on baking quality and their relation to improvement in flour induced by heat and chemical improvers. *Can. J. Research*, **2,** 195-213.

la Guerivière J.-F., Benoualid K., Seince Y., 1971. Essai de cuisson biscuitier. *Bull. C.T.U.* (nouvelle série), Annexe II, 14.

Guillemet R., Haegel J., 1944. L'action des oxydants et des réducteurs sur les protéides de la farine de blé dans ses rapports avec la panification. *C.R. Acad. Agr.*, **217,** 42-43.

Guillemet R., Sonntag G., 1943. L'action des oxydants sur les protéides de la farine de blé. *C.R. Acad. Sci.*, **216,** 420-422.

Henika R. G., Rodgers N. E., 1965. Reaction of cysteine, bromate and whey in a rapid breadmaking process. *Cereal Chem.*, **42,** 397-408.

Kilborn R. H., Tipples K. H., 1973. Factors affecting mechanical development. IV Effect of cysteine. *Cereal Chem.*, **50,** 70-86.

Moss R., 1974. Dough microstructure as affected by the addition of cysteine, potassium bromate and ascorbic acid. *Cereal Sci. Today*, **19,** 557-561.

Moss R., 1975. Bread microstructure as affected by cysteine, potassium bromate and ascorbic acid. *Cereal Foods World.*, **20,** 289-292.

Ofelt C. W., Larmour R. K., 1940. The effect of milk on the bromate requirement of flours. *Cereal Chem.*, **17,** 1-18.

Swanson C. O., Andrews A. C., 1946. Modification of the gas production and gas retention properties of dough by some surface-active, reducing and oxidizing agents. *Cereal Chem.*, **23,** 590-600.

Tsen C. C., 1969. Effects of oxidizing and reducing agents on changes of flour proteins during dough mixing. *Cereal Chem.*, **46,** 435-442.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (3), 299-318.

# Tannage par le formol des aliments protéiques du ruminant. I. — Étude préliminaire du mode d'action du formol sur un substrat protéique modèle

D. TOME, D. BERTRAND, G. VIROBEN et J. DELORT-LAVAL
avec la collaboration technique de
Monique ALLEZ et Françoise KOZLOWSKI

*Laboratoire de Technologie des Aliments des Animaux, I.N.R.A., 44072 Nantes Cedex*

## Résumé

L'efficacité du traitement de tannage des protéines alimentaires en vue de réduire leur solubilité en milieu de rumen dépend du taux d'agent tannant et de son degré de liaison au substrat. Mis en présence d'un substrat protéique modèle (caséine), le formol se trouve sous forme libre, liée réversiblement ou irréversiblement.

La teneur en formol libre ou réversiblement lié des produits traités est déterminée par extraction directe (Fe) ou après hydrolyse (Fh). Pour Fe le meilleur rendement d'extraction est obtenu à pH acide ($\leqslant 2$). Pour Fh, la concentration initiale d'acide phosphorique est un facteur critique; l'entraînement à la vapeur du formol libéré réduit les pertes par recombinaison et les risques d'interférence dans le dosage colorimétrique final.

Lorsque la quantité de formol mise en jeu dans la réaction augmente, sa proportion irréversiblement fixée s'accroît; corrélativement, la solubilité des protéines et leur susceptibilité aux protéases diminuent, le taux et la disponibilité de la lysine décroissent. Cette disparition est partiellement compensée par l'apparition de N-méthyl-lysine. La lyophilisation de la caséine formolée accroît la part relative de la fraction de formol réversiblement liée.

Une méthode de dosage de $F_e$ et $F_h$ est décrite en annexe.

Mots-clefs : *Formol/formaldéhyde, liaisons, tannage, protéines, lysine.*

## I. — Introduction

La solubilité des protéines et leur désamination microbienne dans la panse du ruminant peuvent être réduites soit par un traitement thermique approprié (CHALMERS, JAYASINGHE et MARSHALL, 1964), soit par formation de complexes

avec des substances tannantes naturelles (LEROY, ZELTER et FRANÇOIS, 1964) ou synthétiques (FERGUSON, HEMSLEY et REIS, 1967). Parmi ces dernières, le formaldéhyde se révèle le plus apte à assurer, à faible dose, une protection efficace des protéines alimentaires du ruminant contre l'action de la microflore du rumen, sans que leur digestion et leur absorption dans la suite du tractus digestif en soient notablement altérées (ZELTER, LEROY, TISSIER, 1970). Toutefois, le formaldéhyde est un composé très réactif, susceptible de participer à des réactions d'addition nucléophiles (WALKER, 1964; FEENEY, BLANKENHORN et DIXON, 1975); son action sur les protéines résulte de différents types de mécanismes, qui mettent en jeu des réactions complexes et d'énergies variées pouvant faire intervenir les groupements amine et amide primaire, guanidyle, amide secondaire, indole, thiol, imidazole et les noyaux phénoliques (FRENCH et EDSALL, 1945; WALKER, 1964; FRAENKEL-CONRAT, COOPER et OLCOTT, 1945; FRAENKEL-CONRAT, BRANDON et OLCOTT, 1947; HAWORTH, Mc GILLIVRAY et PEACOCK, 1950; CALDWELL et MILLIGAN, 1972; DELORT-LAVAL et VIROBEN, 1969). La réaction initiale implique la formation rapide et réversible de composés hydroxyméthylés et de bases de Schiff (FRENCH et EDSALL, 1945; FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT, 1948*a*). Des réactions plus lentes et irréversibles interviennent dans un deuxième temps et conduisent à des réticulations inter et intra-moléculaires par formation de ponts méthyléniques entre certains groupements réactifs (FRENCH et EDSALL, 1945; FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT, 1948*a*, *b*; GALEMBECK *et al.*, 1977). Ces ponts méthyléniques impliquent particulièrement les résidus lysyl et tyrosyl suivant une réaction de type « Mannich » (FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT, 1948*b*; ALEXANDER, CARTER et JOHNSON, 1951; BLASS, BIZZINI et RAYNAUD, 1967-1968). Des réticulations entre d'une part les résidus lysyl et d'autre part les groupements amide, guanidyle, imidazole ou indole ont aussi été proposés (FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT, 1948*a* et *b*). Enfin, des liaisons non hydrolysables, impliquant les résidus cycliques et n'intervenant pas dans les phénomènes de réticulation, seraient favorisées en milieu acide et par la chaleur (FRAENKEL-CONRAT, BRANDON et OLCOTT, 1947; SWAIN *et. al.*, 1948; BLASS, BIZZINI et RAYNAUD, 1967). Toutefois, dans les conditions habituelles du tannage, les réactions sont peu nombreuses et le plus souvent réversibles (HARLAN et FEAIRHELLER, 1977).

En raison du nombre et de la variété des réactions possibles, il nous a paru utile, dans les conditions de traitement douces décrites par ZELTER, LEROY et TISSIER (1970) et à des taux de formol voisins de ceux assurant la meilleure efficacité biologique de la protéine protégée pour le ruminant, de déterminer le taux de récupération de cette substance dans différentes conditions d'extraction et de relier ces résultats aux modifications de quelques caractéristiques physico-chimiques de la caséine, choisie comme substrat modèle.

## II. — Matériels et techniques

### 2.1. — *Matériel*

Le substrat protéique modèle est une caséine acide selon HAMMARSTEN (MERCK). Il est traité par une solution technique de formaldehyde à 30 p. 100 environ (PROLABO) dont le titre a été vérifié par la méthode au sulfite de sodium (WALKER, 1964).

## 2.2. — *Techniques*

### 2.21. *Préparation des échantillons formolés*

A une quantité exactement pesée de substrat protéique et à un volume d'eau juste suffisant pour humidifier complètement le produit est ajoutée dans un flacon la solution de formol. Le mélange est homogénéisé puis le flacon, bouché, est conservé à température ambiante durant 24 heures avant lyophilisation.

### 2.22. *Extraction du formol*

#### 2.221. *Extraction directe*

Le substrat est mis en suspension dans une solution aqueuse (1 g/50 ml) soit en milieu acide chlorhydrique (pH 1 ou pH 1,5), soit en milieu tampon citrate 0,1 M (pH 2 ou pH 4), soit en milieu tampon phosphate 0,1 M (pH 7, pH 7,5, pH 8 ou pH 9). Après agitation à température ambiante durant un temps déterminé (entre 5 mn et 15 h), l'extrait est centrifugé à 3 000 g. Les protéines du surnageant sont éliminées par défécation, soit avec 10 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100 (p/v), soit avec le réactif de CARREZ (voir « Annexe ») en ajoutant 2,5 ml de solution 1 et 2,5 ml de solution 2 de ce réactif, puis centrifugation à 3 000 g.

#### 2.222. *Extraction après hydrolyse*

L'hydrolyse de l'échantillon est réalisée en présence d'acide phosphorique selon NITSCHMANN et HADORN (1941). Trois modes opératoires ont été comparés :

— *Hydrolyse sous reflux*

Des quantités déterminées d'échantillon à doser (0 à 1 g) et d'acide phosphorique (1 à 5 ml) pur ($d$ = 1,83) sont introduites dans un ballon rodé de 300 ml contenant 100 ml d'eau; les suspensions obtenues sont portées à ébullition sous reflux. Les protéines sont éliminées par défécation par 10 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100 (p/v) et centrifugation à 3 000 g.

— *Hydrolyse avec distillation*

La méthode, décrite par VAN DOOREN (1975), consiste en une distillation en 2 étapes du formol libéré durant l'hydrolyse acide. Des quantités déterminées d'échantillon et d'acide phosphorique pur ($d$ = 1,83) sont introduites avec 50 ml d'eau distillée dans un ballon de 250 ml sur lequel est adapté un dispositif de distillation; après récupération de 45 ml de distillat, 50 ml d'eau sont réintroduits dans le ballon et 45 ml de distillat recueillis de nouveau.

— *Hydrolyse avec entraînement à la vapeur*

Dans cette variante, déduite des observations de BLASS, BIZZINI et RAYNAUD (1967), 10 ml d'eau et des quantités déterminées de substrat (0 à 1 g) et d'acide phosphorique ($d$ = 1,83) sont introduites dans un matras de 200 ml, relié à un

dispositif d'entraînement à la vapeur (fig. 1). Le volume de distillat recueilli est compris entre 100 et 250 ml.

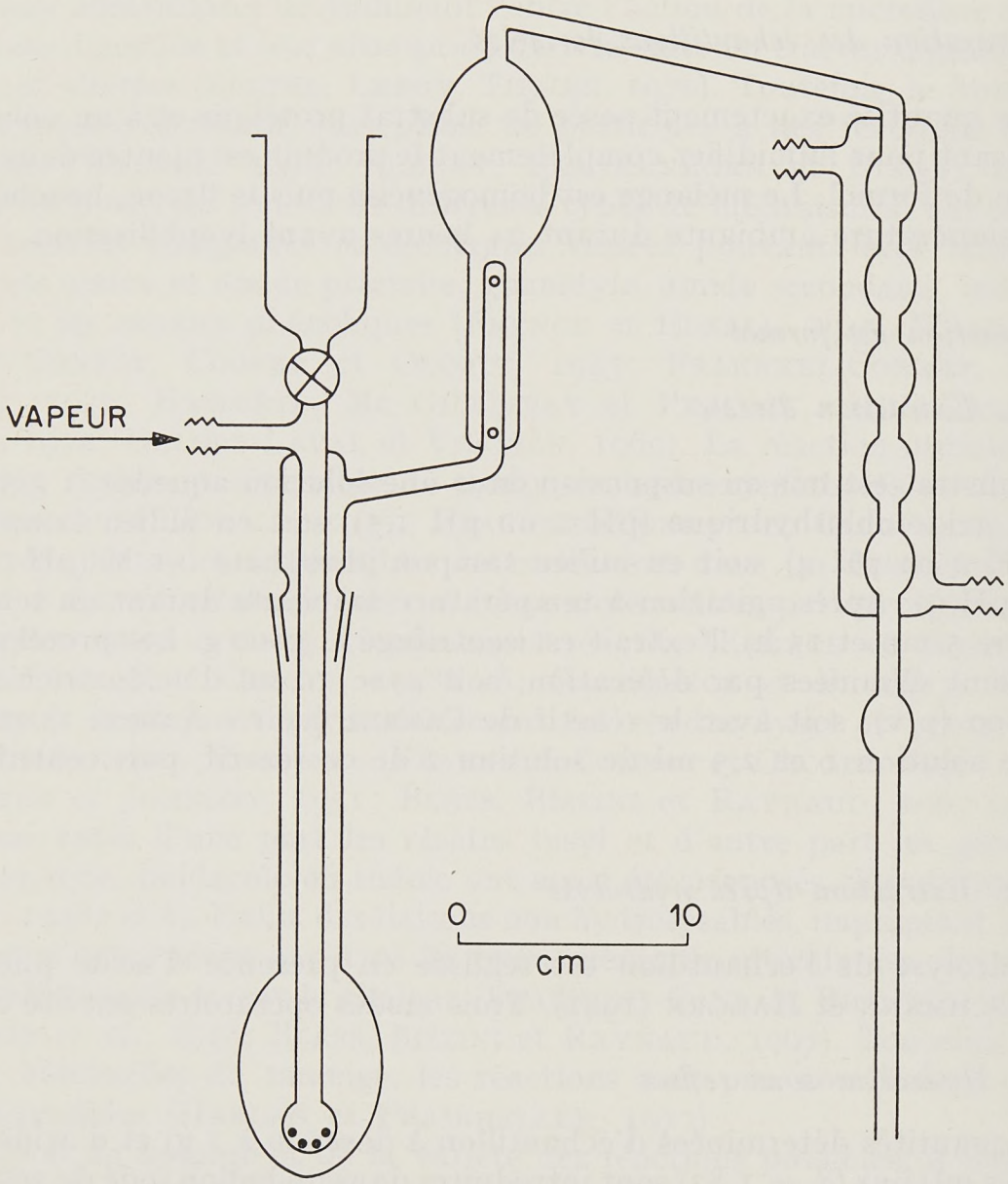



FIG. 1. — *Dispositif d'entraînement à la vapeur.*

### 2.23. *Dosage du formol extrait*

Le formol est dosé dans les extraits par la méthode colorimétrique au réactif de HANTZSCH (NASH, 1953).

### 2.24 *Solubilité de l'azote*

Pour déterminer la solubilité de l'azote, 1 g d'échantillon est mis en suspension dans 100 ml de solution à 40 °C, soit en milieu chlorhydrique 0,075 N, à un pH initial voisin de 1,5, en l'absence ou en présence de pepsine (Calbiochem n° 51.643; 1 : 15 000) durant 20 heures (Anonyme, 1972), soit en milieu tampon phosphate 0,01 M, à un pH initial de 7,5, avec ou sans trypsine (Seravac, 8 000 U. BAEE/mg protéines) durant 7 heures (DELORT-LAVAL et BOZA LOPEZ, 1964); dans ce

dernier cas, le pH est vérifié après 1 heure d'incubation et réajusté à 7,5, si nécessaire, par addition de NaOH N.

L'azote soluble est dosé dans le filtrat d'incubation par la méthode de Kjeldahl et son taux rapporté en pourcentage de l'azote introduit.

2.25. *Dosage des acides aminés*

A l'exception du tryptophane, les acides aminés, libérés par hydrolyse à l'acide chlorhydrique 6 N (500 ml pour 250 mg d'échantillon), sont dosés (Moore, Spackman et Stein, 1958) à l'aide d'un analyseur automatique. Du fait de la présence de formol libre dans les échantillons, la tyrosine est détruite durant l'hydrolyse chlorhydrique (Blass, Bizzini et Raynaud, 1967).

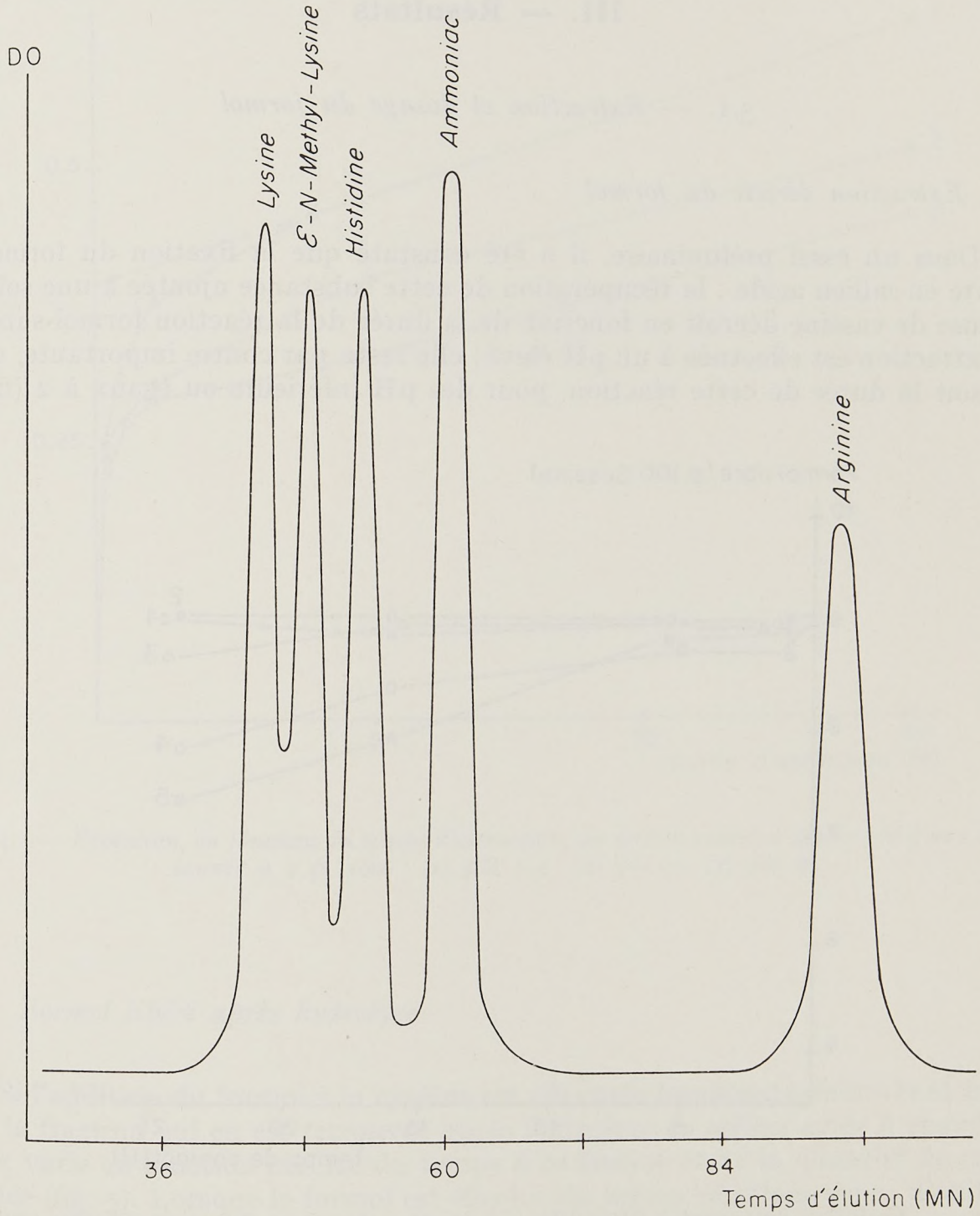



Fig. 2. — *Diagramme d'élution de l'ε-N-méthyl-lysine d'une colonne des acides aminés basiques* selon Moore, Spackmann et Stein (1958).

La séparation des acides aminés basiques est effectuée sur colonne de résine Aminex A5 (Bio-Rad) de 20 cm avec un tampon d'élution de pH 5,28 et à la température de 55 °C. Dans ces conditions, l'ε-N méthyl-lysine émerge entre la lysine et l'histidine (fig. 2). La lysine indisponible, déterminée suivant une modification de la méthode de ROACH, SANDERSON et WILLIAMS (1967), est constituée par la fraction de lysine qui ne réagit pas avec le 2-4-dinitrofluorobenzène en milieu alcalin; dosée par chromatographie sous forme de lysine dans l'hydrolysat acide, elle n'inclut cependant pas l'ε-N méthyl-lysine, dont le groupement ε-aminé n'est pas accessible au réactif mis en jeu et reste stable à l'hydrolyse acide.

## III. — Résultats

### 3.1. — *Extraction et dosage du formol*

#### 3.11. *Extraction directe du formol*

Dans un essai préliminaire, il a été constaté que la fixation du formol est réduite en milieu acide : la récupération de cette substance ajoutée à une solution aqueuse de caséine décroît en fonction de la durée de la réaction formol-substrat, si l'extraction est effectuée à un pH élevé; elle reste par contre importante, quelle que soit la durée de cette réaction, pour des pH inférieurs ou égaux à 2 (fig. 3).

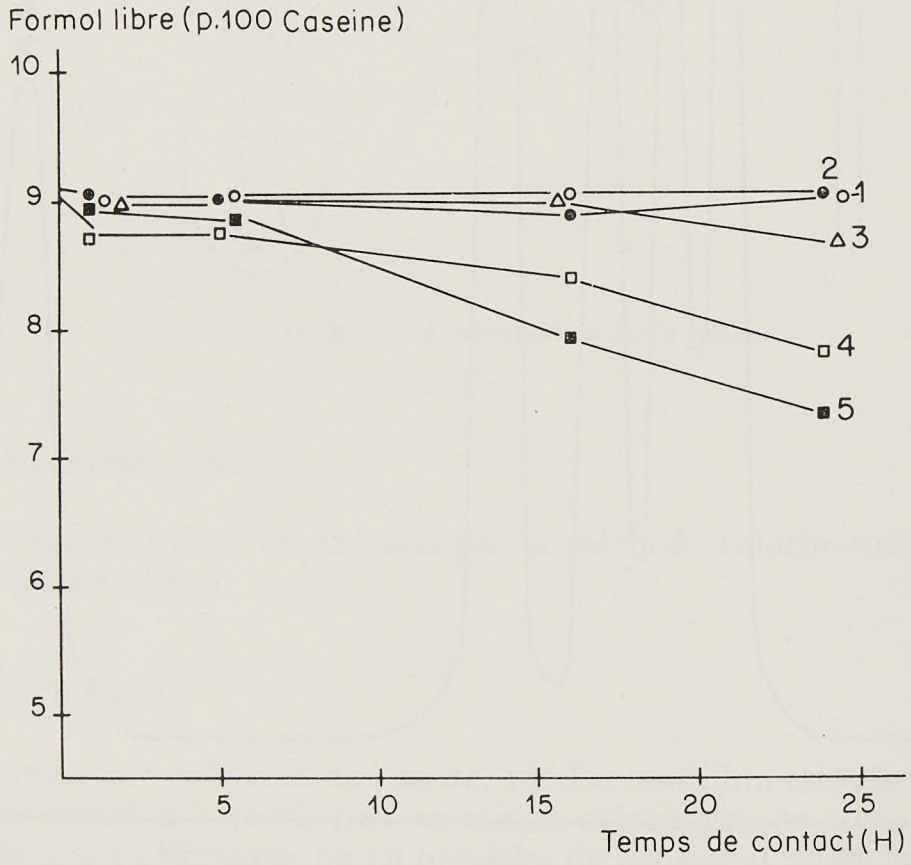



FIG. 3. — *Évolution du formol à l'*état libre *en fonction du temps dans une solution aqueuse de caséine (20g/l) et de formol (0,183 g/l) à divers pH : (1) pH 1; (2) pH 2; (3) pH 4; (4) pH 7; (5) pH 9.*

Parallèlement, la quantité de formol extraite d'un échantillon tanné selon la méthode de référence est d'autant plus élevée que le pH est plus bas, pour un temps d'extraction donné (fig. 4). En fonction de la durée d'extraction, la libération du formol, initialement rapide, évolue ensuite plus lentement (fig. 4). Tout se passe comme si était libérée tout d'abord la fraction de formol n'ayant pas réagi, la deuxième phase correspondant à la libération lente d'une fraction liée faiblement, ou réversiblement. Dans ces conditions, on constate (fig. 4) que la quantié de formol extraite en une heure est comparable au résultat de l'extrapolation linéaire au temps zéro de la phase linéaire de la courbe; c'est de plus au pH le plus acide (1,5) que le rendement de cette extraction est le plus élevé.

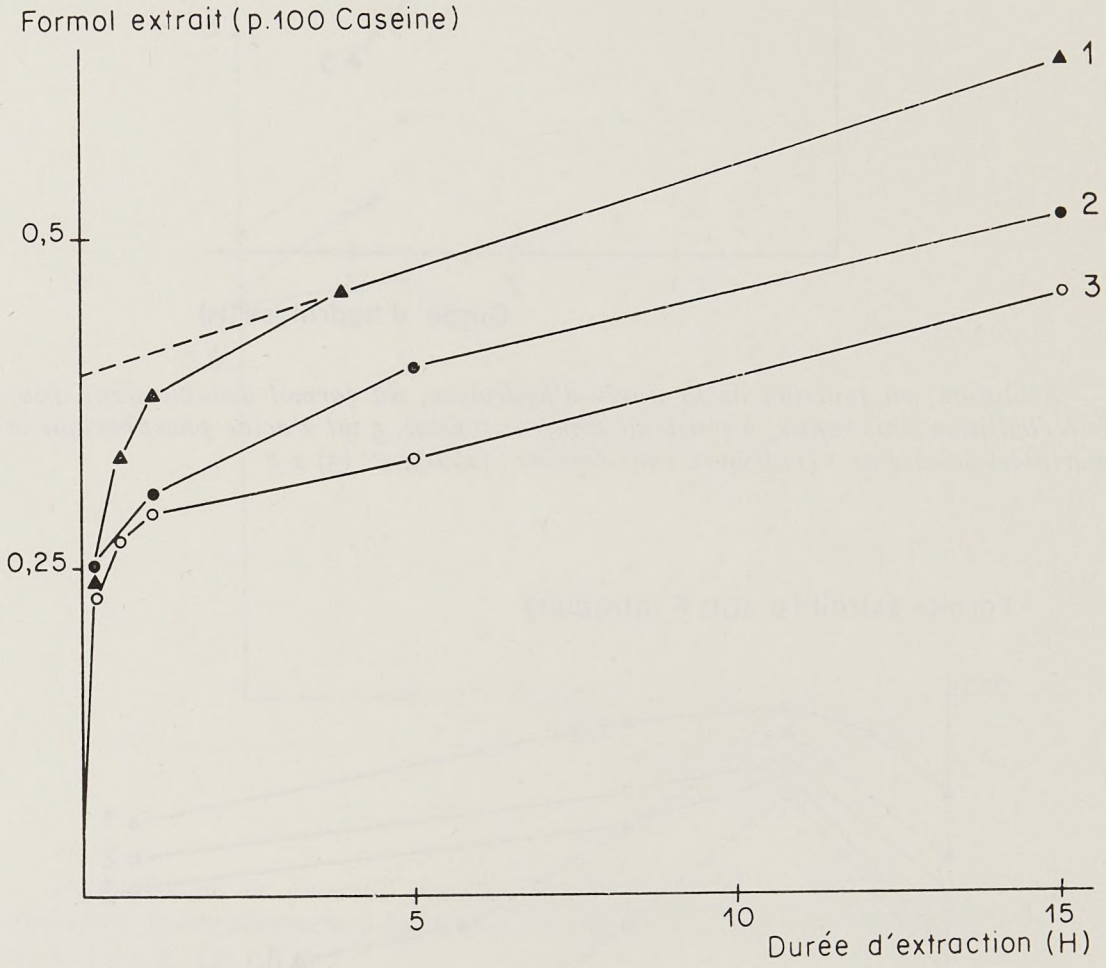



FIG. 4. — *Évolution, en fonction du temps d'extraction, du formol extrait à divers pH d'une caséine tannée à 2 p. 100 :* (1) *pH 1,5;* (2) *pH 7;* (3) *pH 8.*

### 3.12. *Formol libéré après hydrolyse*

Si l'addition du formol à la caséine est effectuée immédiatement avant hydrolyse, la fraction qui en est retrouvée après hydrolyse en milieu acide à chaud sous reflux varie en fonction inverse du temps d'hydrolyse et de la quantité de caséine ajoutée (fig. 5). Lorsque le formol est éliminé du milieu réactionnel par distillation ou entraînement à la vapeur (fig. 6), son taux de récupération passe par un maximum en fonction de la concentration en acide.

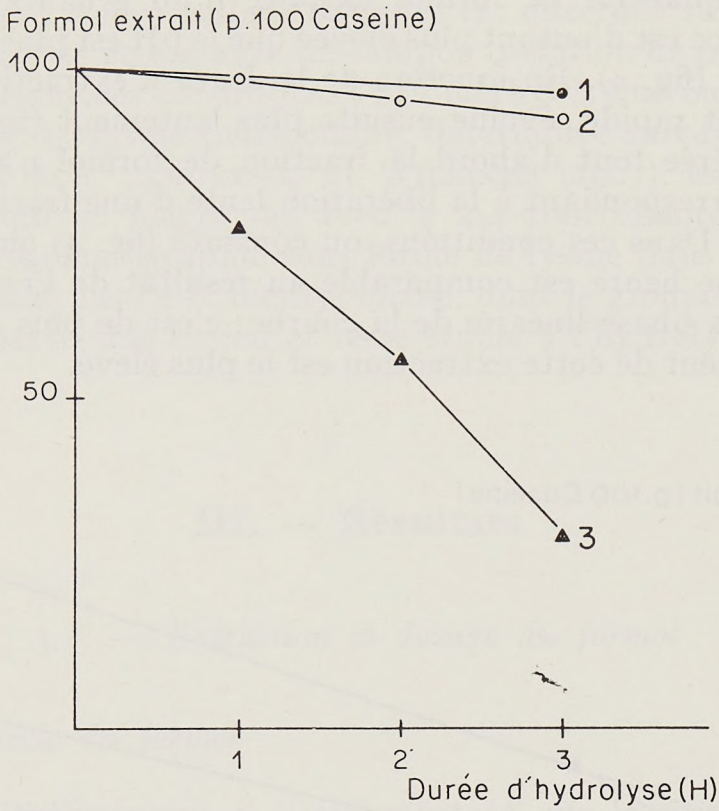



FIG. 5. — *Évolution, en fonction de la durée d'hydrolyse, du formol dosable dans 100 ml d'eau portée à ébullition sous reflux, à partir de 6 mg de formol, 5 ml d'acide phosphorique et de quantités variables de caséine :* (1) *témoin sans caséine ;* (2) *0,2 g ;* (3) *1 g.*

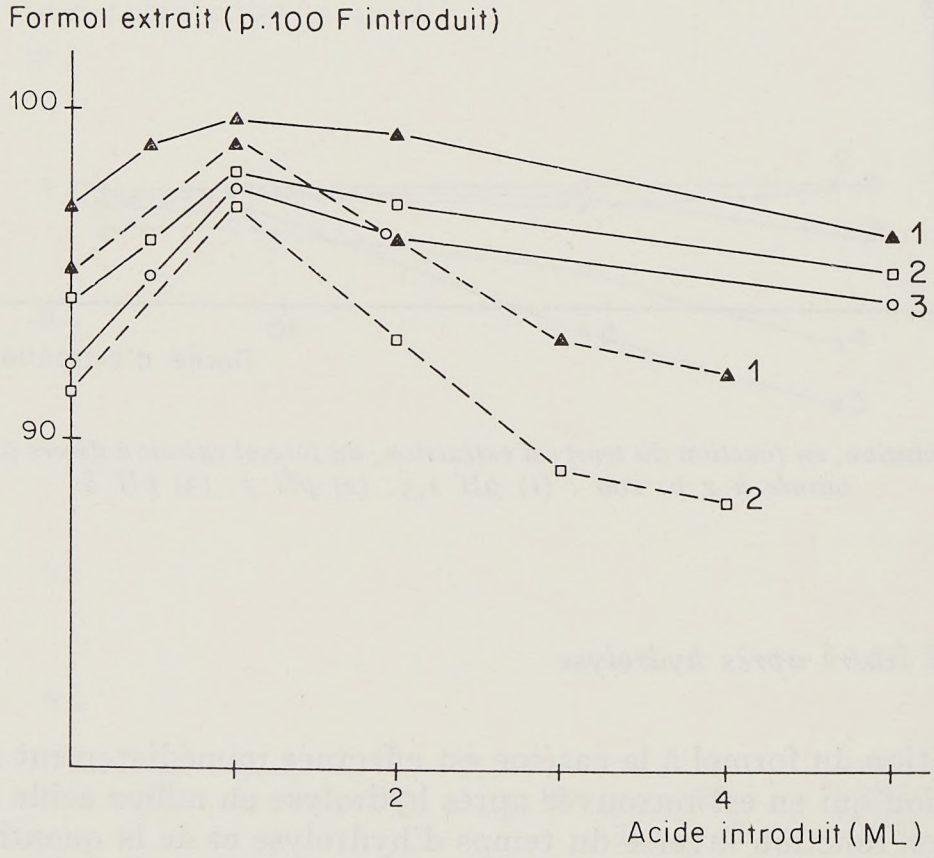



FIG. 6. — *Influence de la quantité d'acide phosphorique sur le pourcentage d'extraction du formol par hydrolyse avec distillation* (------) *ou entraînement à la vapeur* (——), *en présence de quantités variables de caséine :* (1) *0,5 g ;* (2) *1 g ;* (3) *2 g.*

De même, le pourcentage de formol libéré par hydrolyse et entraînement à la vapeur d'un échantillon de caséine, tanné selon la méthode de référence, passe par un maximum en fonction de la concentration en acide : ce maximum est d'autant plus élevé que la quantité de substrat est plus faible (fig. 7). Dans les conditions optima d'hydrolyse, c'est donc la technique d'entraînement à la vapeur qui assure le meilleur rendement d'extraction, en limitant les pertes par recombinaison du formol.

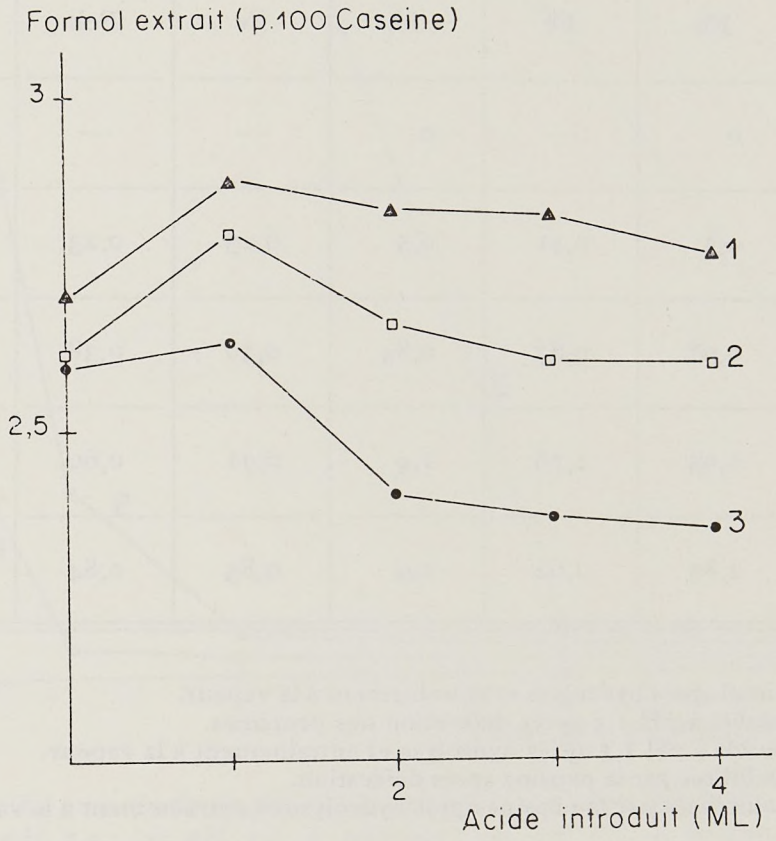



FIG. 7. — *Influence de la quantité d'acide phosphorique sur le pourcentage de formol extrait, par hydrolyse et entraînement à la vapeur, de différentes quantités de caséine tannée à 5 p. 100 :* (1) *0,5 g ;* (2) *1 g ;* (3) *1,5 g.*

### 3.13. *Extraction du formol avant et après lyophilisation*

Le rendement d'extraction du formol par hydrolyse (Fh) du complexe formol-protéine est pratiquement maximum pour des taux de formol inférieurs ou égaux à 1 p. 100 et diminue légèrement au-delà de ce taux ; il est toujours plus faible après lyophilisation. La fraction de formol acido-labile ou formol réversiblement lié (Fr), correspondant à la différence Fh — Fe, est toujours plus importante après lyophilisation (tabl. 1) ; il apparaît donc sous l'action de ce traitement une fixation réversible du formol au substrat protéique.

TABLEAU I

*Récupération de doses croissantes de formol dans diverses fractions azotées de caséine*

| Formol mis en jeu (pour cent) | Avant lyophilisation | | Après lyophilisation | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fh | Fe | Fh | Fe | Feh | Fpe | Fpeh |
| 0 | 0 | — | 0 | — | — | — | — |
| 0,5 | 0,5 | 0,41 | 0,5 | 0,23 | 0,23 | 0,24 | 0,32 |
| 1. | 0,98 | 0,87 | 0,84 | 0,38 | 0,38 | 0,41 | 0,70 |
| 2. | 1,95 | 1,76 | 1,4 | 0,71 | 0,69 | 0,74 | 1,08 |
| 3. | 2,85 | 2,62 | 1,9 | 0,85 | 0,84 | 0,85 | 0,98 |

Fh : sur l'échantillon total après hydrolyse et entraînement à la vapeur.
Fe : sur la fraction soluble à pH 1,5 après défécation des protéines.
Feh : sur la fraction soluble à pH 1,5 après hydrolyse et entraînement à la vapeur.
Fpe : sur la fraction solubilisée par la pepsine après défécation.
Fpeh : sur la fraction solubilisée par la pepsine après hydrolyse et entraînement à la vapeur.

## 3.2. — *Modification de quelques propriétés physicochimiques d'une caséine tannée par la méthode de référence*

### 3.21. *Étude des fractions de caséine solubilisées en présence ou en l'absence de protéases*

La solubilité de l'azote, en présence et en l'absence de protéases, diminue lorsque la quantité de formol mis en jeu augmente (fig. 8).

En l'absence d'enzyme et à pH 1,5, le formol n'est pas lié à la fraction azotée soluble puisque la teneur en formol reste la même dans la solution après précipitation des protéines (Fe) qu'après hydrolyse (Feh) (tabl. 1). Par contre, une partie du formol est liée à la fraction protéique solubilisée par la pepsine : les quantités de formol dosées dans cette fraction après hydrolyse (Fpeh) sont toujours supérieures à celles dosées après défécation des protéines (Fpe) (tabl. 1).

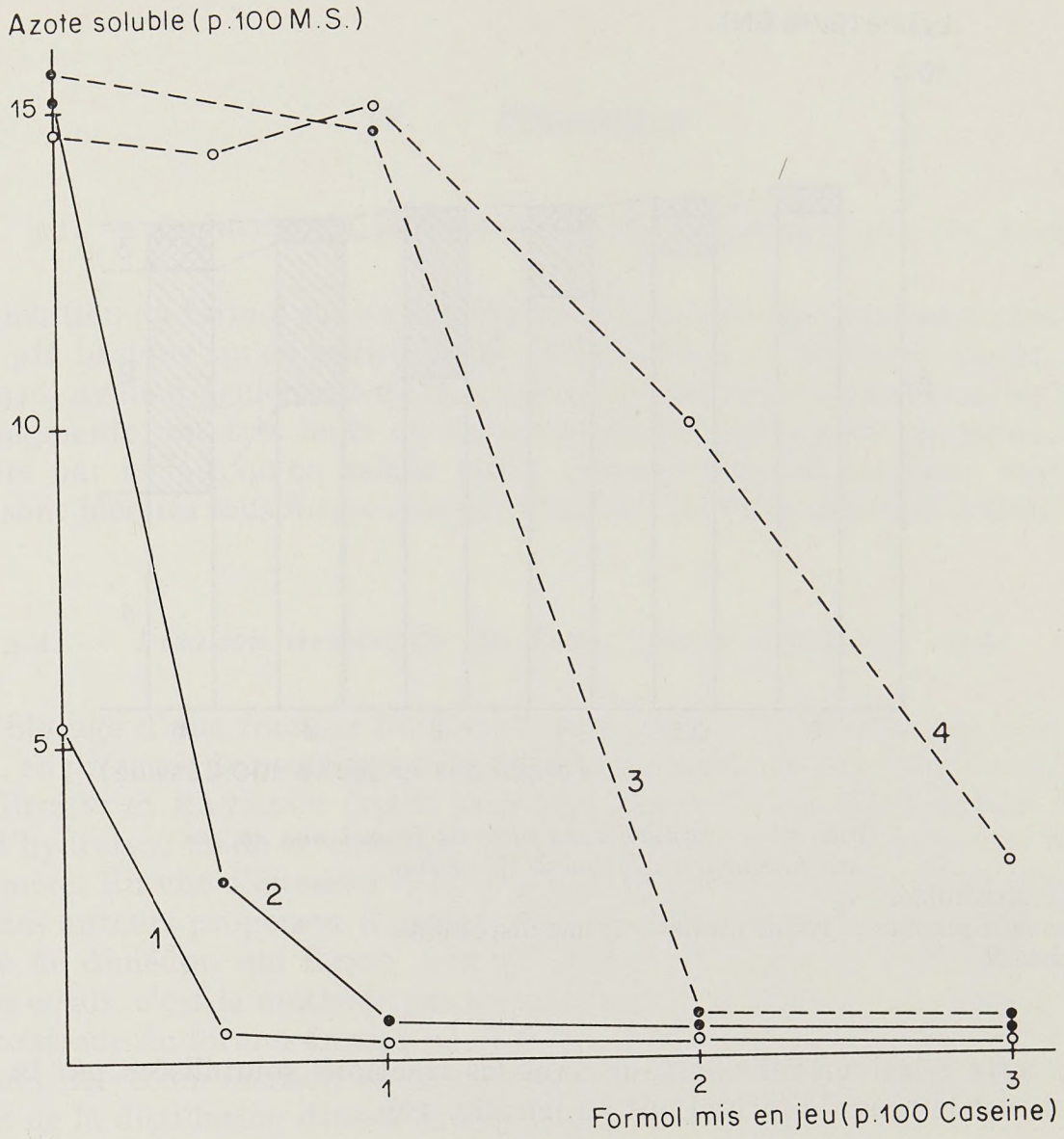



FIG. 8. — *Influence du formol mis en jeu sur la solubilité de l'azote de caséine tannée :* (1) *pH 1,5 ;* (2) *pH 7,5 ;* (3) *pH 7,5 + trypsine ;* (4) *pH 1,5 + pepsine.*

### 3.22. *Composition en acides aminés des fractions de caséine traitée*

Le traitement de la caséine par des doses croissantes de formol se traduit par une modification du taux de lysine, les autres acides aminés, en dehors peut-être de la tyrosine et du tryptophane, n'étant pas sensiblement affectés.

Lorsque la quantité de formol mise en jeu augmente, la teneur en lysine du substrat diminue et une partie de plus en plus importante de cet acide aminé est sous forme indisponible; on observe de plus l'apparition d'une petite quantité d'un composé X s'éluant au même niveau que l'ε-N-méthyl-lysine (fig. 9). Dans tous les cas, la somme lysine dosée + composé X reste légèrement inférieure à la lysine totale du témoin et tend à diminuer lorsque la quantité de formol ajoutée augmente.

L'analyse des fractions solubilisées par la pepsine révèle la présence du composé X à un taux proportionnel à celui de l'azote soluble. Par contre, le pourcentage de la lysine indisponible, exprimé par rapport à la lysine totale de la fraction étudiée, qui augmente fortement avec le formol introduit dans les échantillons

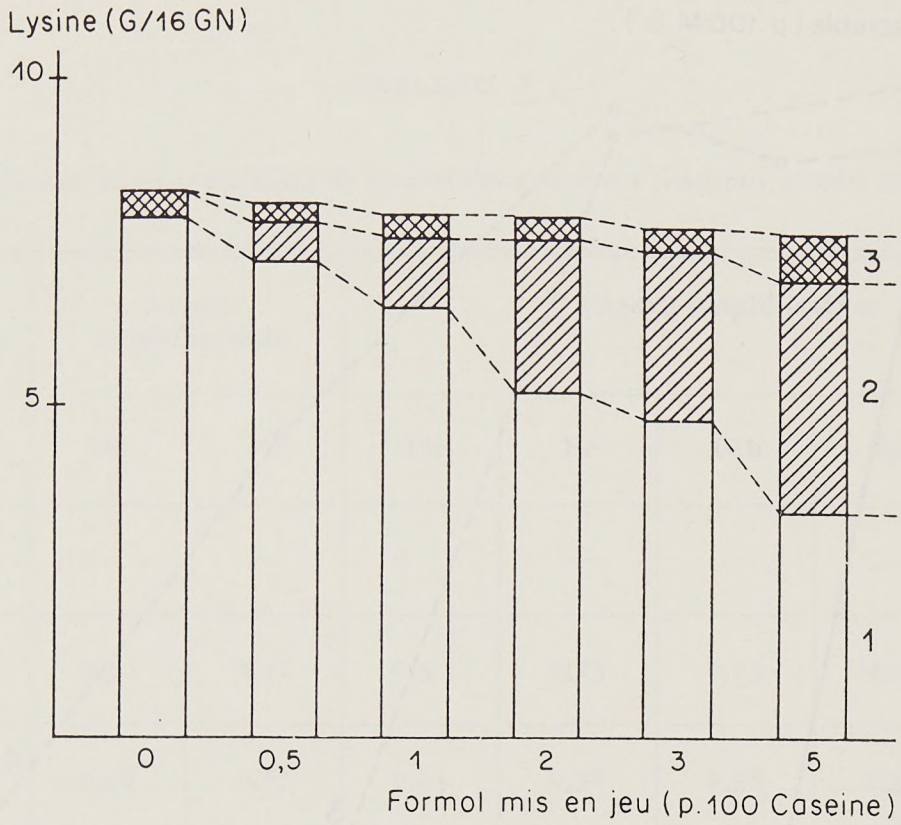



FIG. 9. — *Influence du taux de formol mis en jeu sur la teneur en lysine de la caséine.*

1. Lysine disponible.
2. Lysine indisponible = lysine totale — lysine disponible.
3. Composé X.

totaux, reste relativement constant dans les fractions solubilisées par la pepsine quel que soit le taux de formol mis en jeu (fig. 10).

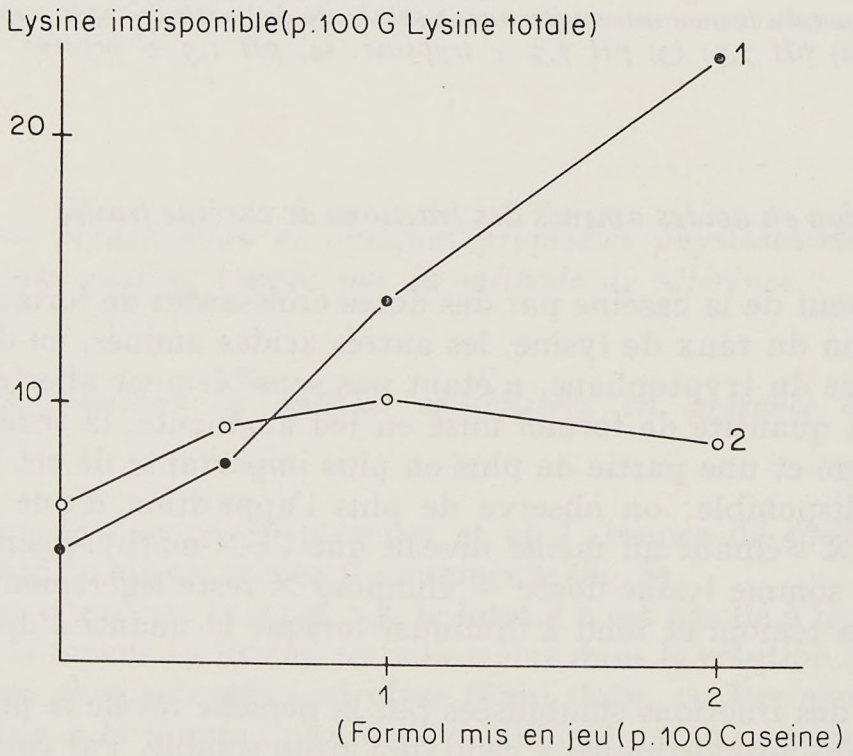



FIG. 10. — *Évolution de la fraction de lysine « indisponible » en fonction du taux de formol ajouté à une caséine, dans l'échantillon total* (1) *et dans l'extrait soluble en présence de pepsine* (2).

## IV. — Discussion

### 4.1. — *Influence du pH sur la réaction du formol avec les protéines*

La fixation du formol sur un substrat protéique est dans nos essais plus importante à pH basique qu'en milieu acide. Highberger et Retzsch (1938), Swain *et al.* (1948) avaient également montré que la fixation du formol, favorisée lorsque le pH augmente, est très lente en milieu acide. Ce phénomène est généralement interprété par le fait qu'en milieu acide, certains sites nucléophiles, réactifs au formol, sont bloqués sous forme chargée (Feeney, Blankenhorn et Dixon, 1975).

### 4.2. — *Fixation irréversible du formol durant l'hydrolyse acide*

Le blocage d'une fraction du formol sous forme non libérable en milieu acide à chaud, en présence de protéines, a déjà été mis en évidence par Swain *et al.* (1948). Blass, Bizzini et Raynaud (1968) suggèrent que le formol libéré durant les processus d'hydrolyse acide se combine secondairement avec la tyrosine en formant un polymère. En vue d'éliminer le formol libre au fur et à mesure de sa formation, ces mêmes auteurs proposent d'opérer, soit par entraînement à la vapeur, soit en présence de dimedon qui forme, avec le formol, un composé insoluble. De fait, dans nos essais, c'est la méthode par entraînement à la vapeur qui, grâce à l'élimination continue du formol durant l'hydrolyse, favorise sa récupération, en limitant les risques de recombinaison et en évitant une concentration de l'acide, comme au cours de la distillation directe proposée par Van Dooren (1975).

### 4.3. — *Formol hydrolysable et non hydrolysable*

L'hydrolyse ne libère pas la totalité du formol combiné d'un échantillon tanné (Van Dooren, 1976). Cette fraction non libérable varie avec le degré de traitement et la nature de la source protéique (Harlan et Feairheller, 1977); dans les conditions relativement douces du tannage des protéines alimentaires (Zelter, Leroy et Tissier, 1970), elle reste faible et l'hydrolyse acide avec entraînement à la vapeur conduit à des récupérations quantitatives. La lyophilisation provoque une réduction du taux de formol hydrolysable; cette substance pourrait donc se trouver en partie liée au substrat de manière irréversible par suite de ce traitement. Cette fraction non hydrolysable correspond notamment au formol impliqué dans les liaisons de type Mannich faisant intervenir principalement les résidus lysyl et tyrosyl (Blass, Bizzini et Raynaud, 1967); elle pourrait inclure le composé X que sa position d'élution identifie à l'ε-N-méthyl-lysine. Le fait que cette fraction X, bien que décelable sur les chromatogrammes, ne soit pas dosable avant lyophilisation (Tome, résultats non publiés) montre que, durant la lyophilisation, une fraction du formol se fixe de façon non hydrolysable sur la caséine. Toutefois, étant donné la formation limitée du composé X, cette fixation doit rester faible, notamment pour des taux de formol mis en jeu inférieurs à 1 p. 100.

La fraction de formol acido-labile (Fr) correspond à des liaisons réversibles avec les protéines. Cette fraction est principalement composée des dérivés méthylols, produits d'addition du formol sur les sites nucléophiles (FRENCH et EDSALL, 1945) ; elle pourrait provenir en partie de la fraction de lysine « indisponible ». Son augmentation après lyophilisation peut s'interpréter comme étant liée à un effet de concentration du formol par suite de l'élimination de l'eau, conduisant à une activation de la fixation.

En dehors de la lysine, il est probable que d'autres acides aminés interviennent dans les mécanismes. Le fait que ces modifications n'apparaissent pas dans nos analyses peut s'expliquer, soit par la réversibilité des liaisons (composés méthylols, par exemple), soit par la trop faible proportion de groupements concernés.

### 4.4. — *Étude des fractions solubilisées*

C'est en raison des implications nutritionnelles du procédé de tannage (ZELTER, DUVIVIER-LEROY et DELORT-LAVAL, 1969) que l'examen de la solubilisation des fractions azotées de substrats protéiques formolés a été abordé. Le présent travail met en évidence l'existence d'une gamme de traitements correspondant à des doses de formol inférieures à 1 p. 100, dans laquelle la solubilité azotée est suffisamment réduite, sans que la susceptibilité aux enzymes soit sensiblement affectée: c'est dans cette zone qu'il est possible de réduire la désamination microbienne dans la panse du ruminant, tout en conservant une digestion efficace des protéines traitées dans la suite du tractus digestif. Il s'agit donc d'un domaine de réaction étroit que les études enzymatiques peuvent aider à définir. Pour des doses de formol supérieures à 1 p. 100, la dégradabilité enzymatique diminue rapidement ; la libération des acides aminés dans le tractus digestif pourrait s'en trouver affectée.

## V. — Conclusion

Compte tenu des données de la bibliographie et de nos propres résultats, on peut considérer en première approximation que le formol est présent dans un aliment protéique tanné sous trois formes principales : 1) à l'état libre, n'ayant pas réagi ou très faiblement fixé par des liaisons de nature électrostatique ; 2) fixé de façon réversible, notamment sous forme de composés méthylols ; 3) irréversiblement lié, sous forme de diverses combinaisons non hydrolysables.

L'importance de ces différentes fractions, ainsi que la solubilité des matières azotées et la susceptibilité aux enzymes protéolytiques des substrats tannés, dépendent du taux de formol mis en jeu et du mode de traitement. Sur le plan analytique, le formol dosé après extraction directe (Fe) comprend principalement la fraction de formol à l'état libre ou faiblement fixée. Le formol dosé après hydrolyse phosphorique (Fh) correspond vraisemblablement à la somme du formol n'ayant pas réagi, du formol fixé sous forme de méthylol et d'une fraction de formol impliquée dans des combinaisons réversibles encore mal connues. Sur ces bases, la différence Fh — Fe représenterait donc la quantité de formol réversiblement liée (Fr.) L'estimation de la quantité de formol irréversiblement fixé devrait faire appel

aux isotopes radioactifs (Bowes *et al.*, 1965) ou à des méthodes indirectes de bilan entre le formol introduit et récupéré après hydrolyse.

Le mode opératoire donné en annexe permet de déterminer les quantités de formol extractibles (Fe), hydrolysables (Fh) et réversiblement fixées (Fr) dans un aliment protéique tanné.

*Reçu pour publication en octobre 1979.*

## Remerciements

Les premiers résultats de ce travail ont été obtenus par J.P. Tissier que nous tenons à remercier.

## Summary

*Formaldehyde treatment of dietary proteins for ruminants*

*I. — Preliminary study of the action of formaldehyde on a casein substrate*

The efficiency of the tanning treatment of dietary proteins to reduce their solubility in the rumen is a direct function of the quantity of tanning agent and its degree of binding to the substrate. In the presence of a model protein substrate (casein), formaldehyde is found either in the free form, or reversibly or irreversibly bound.

Free or reversibly bound formaldehyde are determined in the treated products by direct extraction (Fe), or after acid hydrolysis (Fh). For Fe, the best yield is obtained from a solution of pH $\leqslant$ 2. For FH, the initial phosphoric acid concentration is a critical factor; losses caused by recombination are reduced by steam distillation of the formaldehyde.

The higher the amount of formaldehyde used in the reaction, the higher its irreversibly bound proportion and the amount of ε-N-methyl-lysin; at the same time the solubility of the protein, its susceptibility to proteolytic enzymes and the amount and availability of lysin decrease. A description of the method of determination of Fe and Fh is given in an annex.

Key words : *formaline/formaldehyde reaction, taning, proteins, lysin.*

## Références bibliographiques

Alexander P., Carter D., Johnson K. G.. 1951. Formation by formaldehyde of a cross-link between lysin and tyrosin residues in wool. *Biochem. J.*, **48,** 435-441.

Blass J., Bizzini B., Raynaud M., 1967. Étude sur le mécanisme de la détoxification des toxines protéiques par le formol. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **10,** 3957-3965.

Blass J., Bizzini B., Raynaud M., 1968. Études sur le mécanisme de la détoxification des toxines protéiques par le formol. I. — Incorporation de la lysine libre radioactive dans la toxine diphtérique pure, en présence de formol (détoxification dite irréversible). *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **115,** 881-898.

Caldwell J. B., Milligan B., 1972. The sites of reaction of wool with formaldehyde. *Text. Res. J.*, **42,** 122-124.

CHALMERS M. L., JAYASINGHE J. B., MARSHALL S. B. M., 1964. The effect of heat treatment in the processing of ground-nut meal on the value of the protein for the ruminants, with some additional experiments on copra. *J. Agric. Sci.*, **63,** 283-287.

DELORT-LAVAL J., BOZA LOPEZ Z., 1964. Efficacité de quelques protides alimentaires chez le porc. *V. Ann. Zootech.*, **13,** 35-50.

DELORT-LAVAL J., VIROBEN G., 1969. Taux et disponibilité de la lysine et de la tyrosine dans les protéines protégées par certaines substances tannantes (formaldéhyde, extrait tannant de châtaignier), contre la désamination en milieu de rumen. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **269,** 1558-1561.

FEENEY R. E., BLANKENHORN G., DIXON H. D. F., 1975. Carbonyl-amine reactions in protein chemistry. in « *Advances in Protein Chemistry* », Acad. Press., New York, **29,** 136-203.

FERGUSON K. A., HEMSLEY T. A., REIS P. J., 1967. The effect of protecting dietary protein from microbial degradation in the rumen. *Aust. J. Sci.*, **30,** 215-217.

FRAENKEL-CONRAT H., BRANDON B. A., OLCOTT H. S., 1947. The reaction of formaldehyde with proteins. IV. — Participation of indole group gramicedin. *J. Biol. Chem.*, **168,** 99-108.

FRAENKEL-CONRAT H., COOPER M., OLCOTT H., 1945. The reaction of formaldehyde with proteins. *J. Amer. Chem. Soc.*, **67,** 950-954.

FRAENKEL-CONRAT H., OLCOTT H. S., 1948*a*. The reaction of formaldehyde with proteins. V. — Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J. Am. Chem. Soc.*, **70,** 2673-2684.

FRAENKEL-CONRAT H., OLCOTT H. S., 1948*b*. Reaction of formaldehyde with proteins. VI. — Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups. *J. Biol. Chem.*, **174,** 827-843.

FRENCH O., EDSALL J. T., 1945. The reactions of formaldehyde with amino acids and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, Acad. Press., New York, **2,** 277-355.

GALEMBECK F., RYAN D. S., WHITAKER J. R., FEENEY R. E., 1977. Reaction of protein with formaldehyde in the presence and absence of sodium borohydride. *J. Agric. Food Chem.*, **25,** 238-245.

HARLAN J. W., FEAIRHELLER S. H., 1977. Chemistry of the cross-linking of collagen during tanning. in « *Protein cross-linking* », Mendel Friedman ed., Plenum Press. New York and London, 425-440.

HAWORTH R. D., Mc GILLIVRAY R., PEACOCK D. H., 1950. The action of formaldehyde on proteins. *J. Chem. Soc.*, 1493-1498.

HIGHBERGER J. H., RETZSCH C. E., 1938. The combination of formaldehyde with collagen. *J. Am. Leath. Chem. Ass.*, **34,** 131-148.

LEROY F., ZELTER S. Z., FRANÇOIS A., 1964. Protection des protéines alimentaires contre la désamination bactérienne au niveau du rumen. Étude en rumen artificiel, *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **259,** 1592-1595.

MOORE S., SPACKMAN D. H., STEIN W. H., 1958. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins, *Anal. Chem.*, **30,** 1185-1190.

NASH T., 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the HANTSCH reaction. *Biochem. J.*, **55,** 416-421.

NITSCHMANN H., HADORN H., 1941. Ueber eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Formaldehyds in mit Formalin gehärtetem Casein. *Helv. Chim. Acta*, **24,** 237-242.

ROACH A. G., SANDERSON P., WILLIAMS D. R., 1967. Comparison of methods for the determination of available lysin value in animal and vegetable protein sources. *J. Sci. Fd. Agric.*, **18,** 274-278.

SWAIN A. P., KOKES E. L., HIPP N. J., WOOD J. L., JACKSON R. W., 1948. Combination of formaldehyde with casein. *Ind. Eng. Chem.*, **40,** 465-469.

VAN DOOREN P. H., 1975. A modified method for the estimation of bound formaldehyde in treated feed proteins. *J. Sci. Fd. Agric.*, **26,** 1263-1271.

VAN DOOREN P. H., 1976. A rapid microdistillation method for the release of bound formaldehyde from treated feedstuffs. *J. Sci. Agric.*, **27,** 51-53.

WALKER J. F., 1964. Formaldehyde. ROBERT E. KRIEGER Publishing Company Huntington, New York.

ZELTER S. Z., DUVIVIER-LEROY F., DELORT-LAVAL J., 1969. Effet du tannage des protéines alimentaires sur leur efficacité nutritive chez le ruminant. *Association française de Zootechnie*, rapport n° 26, 9 p.

ZELTER S. Z., LEROY F., TISSIER, 1970. Protection des protéines alimentaires contre la désamination bactérienne dans le rumen. I. — Étude in vitro : comportement en milieu de rumen de quelques protéines tannées avec du tannin de châtaignier ou certains aldéhydes (formaldéhyde, glutaraldéhyde, glyoxal). *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **10,** 111-122.

Anonyme, 1972. Dosage des protéines brutes solubilisées par la pepsine et l'acide chlorhydrique. *J.O.C.E.*, L. **123,** (29-5-72), 11-12.

## Annexe

*Détermination du formol extractible et du formol libéré après hydrolyse*

### 1. — *Objet et domaine d'application*

Dans un aliment protéique tanné en vue d'une protection efficace contre la désamination en milieu de rumen, le formol est présent sous trois formes principales :

1) à l'état libre;
2) fixé par divers degrés de liaisons réversibles et libérales dans des conditions déterminées;
3) fixé par des liaisons irréversibles, non dosable directement.

La méthode proposée ne porte que sur la détermination du formol à l'état libre et du formol fixé par des liaisons réversibles.

### 2. — *Principe*

Les formes sous lesquelles le formol est présent dans un aliment tanné sont caractérisées par deux modes de libération :

— le formol extractible en solution aqueuse à 20 °C sans hydrolyse (Fe);
— le formol libéré après hydrolyse en milieu acide et à chaud (Fh).

### 3. — *Réactifs*

3.1. *Réactif de Carrez*

— Solution 1 : ferrocyannure de potassium à 10,6 p. 100 (p : v) dans l'eau;
— Solution 2 : acétate de zinc à 23,8 p. 100 (p : v) dans l'eau.

3.2. *Réactif de Hantzsch*

— 150 g d'acétate d'ammonium.
— 3 ml d'acide acétique.
— 2 ml d'acétyl acétone.

Compléter à 1 litre avec de l'eau.

3.3. *Acide chlorhydrique 0,075, N*

3.4. *Solution d'étalonnage*

— Solution aqueuse de formol à 6 mg/l.

Le titre précis de la solution mère de formol peut être déterminé par la méthode au sulfite de sodium (WALKER, 1964).

3.5. *Acide orthophosphorique* (*d* : 1,83)

## 4. — *Appareillage*

4.1. *Système d'entraînement à la vapeur* (fig. 1)

Le système comprend un générateur de vapeur permettant son injection dans un matras rodé de 250 ml; après passage dans un vase d'expansion, la vapeur est condensée dans un réfrigérant droit; le condensat est recueilli dans une fiole jaugée de 250 ml.

4.2. *Appareil d'agitation magnétique*

4.3. *Centrifugeuse*

4.4. *Bain-marie à 50 ± 1 °C*

4.5. *Spectrophotomètre*

## 5. — *Mode opératoire*

5.1. *Préparation des échantillons*

Broyer l'échantillon au broyeur à marteaux (grille à trous de 1 mm de diamètre) et l'homogénéiser.

5.2. *Extraction du formol*

5.21. *Extraction de Fe*

Placer, dans un tube à centrifuger de 100 ml, une prise d'essai d'environ 1 g exactement pesée et 50 ml de solution d'acide chlorhydrique 0,075 N. Agiter pendant 1 heure à température ambiante. Ajouter ensuite 2,5 ml de solution 1, puis 2,5 ml de la solution 2 du réactif de CARREZ (3.1.). Laisser reposer 15 mn à température ambiante. Centrifuger 15 mn à 3 000 g. Le dosage (5.3.) est réalisé sur le surnageant.

5.22. *Extraction de Fh*

Introduire, dans le matras rodé de 250 ml, environ 500 mg de prise d'essai exactement pesée; ajouter 10 ml d'eau et 1 ml d'acide orthophosphorique (3.5.). Fixer le matras sur le système d'entraînement à la vapeur et distiller. Récupérer environ 250 ml de distillat dans une fiole jaugée. Ajuster ce volume avec de l'eau. Le dosage (5.3.) est effectué sur le distillat.

5.3. *Dosage colorimétrique du formol*

5.31. *Courbe d'étalonnage*

Une courbe d'étalonnage est établie à l'aide de la solution étalon en introduisant dans 6 tubes à essai les quantités suivantes :

| N° tube | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Solution étalon ml | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| soit formol µg | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 | 36 |
| Eau distillée en ml | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 |

Ajouter dans chaque tube 5 ml de réactif 3.2.; homogéniser; placer les tubes au bain-marie à 50 °C pendant 20 mn; laisser refroidir 15 mn. Lire l'absorbance à 412 nm contre le tube n° 0; établir la courbe de l'absorbance (A) en fonction de la quantité de formol mise en jeu.

5.32. *Dosage de l'extrait*

Introduire dans un tube à essai un volume d'extrait contenant une quantité de formol comprise entre 3 et 30 mcg; compléter à 5 ml avec de l'eau. Ajouter 5 ml de réactif 3.2.; placer le tube au bain-marie à 50 °C pendant 20 minutes; laisser refroidir 15 minutes. Lire l'absorbance à 412 nm par rapport au tube n° 0 de la série d'étalonnage. Déduire la quantité de formol de la courbe d'étalonnage.

## 6. — *Expression des résultats*

6.1. *Mode de calcul*

La teneur en formol est exprimée en g par kg de produit, suivant la formule :

$$F = \frac{V}{v} \times \frac{x}{m} \times 1\,000$$

avec : V = volume de l'extrait en ml.

$v$ = volume de la prise d'essai pour la réaction colorimétrique, en ml.

$m$ = poids de la prise d'essai de l'échantillon, en g.

$x$ = quantité de formol en g, déduite de la courbe d'étalonnage.

Si $V_1 = 55$ pour le dosage Fe et $V_2 = 250$ pour le dosage Fh, il vient :

$$F_e = \frac{x_1}{v_1 \times m_1} \times 5{,}5 \times 10^4$$

$$F_h = \frac{x_2}{v_2 \times m_2} \times 2{,}5 \times 10^5$$

### 7. — *Répétabilité*

La répétabilité est de l'ordre de 5 p. 100 en valeur relative pour une absorbance supérieure ou égale à 0,100.

### 8. — *Procès-verbal*

Le procès-verbal doit indiquer la teneur en Fe, exprimée en g/kg, et la teneur en Fh exprimée en g/kg. On peut en déduire le formol réversiblement lié : Fr = Fh — Fe.

*Ann. Technol. agric* 1979, **28** (3), 319-332.

# Influence de l'âge sur les caractéristiques de la couleur des viandes bovines de la race limousine

M. RENERRE, C. VALIN

Avec la collaboration technique
de J.L. FOURNIER et R. LABAS

*Station de Recherches sur la Viande*
*Centre de Recherches de Clermont-Ferrand*
*C.R.Z.V.—I.N.R.A., Theix 63110 Beaumont*

## Résumé

Pour des taurillons limousins en croissance intensive, l'augmentation de la teneur en fer héminique des muscles est particulièrement rapide jusqu'à l'âge de 16 mois. D'une façon générale, l'âge et le sexe des animaux sont les deux facteurs principaux qui influent sur l'augmentation de la teneur en pigment. Le poids n'apparaît pas, à âge constant, comme devant affecter significativement la teneur en pigment, du moins pour la tranche d'âge étudiée, entre 9 et 24 mois.

Au niveau des caractéristiques de couleur de la viande et de leur stabilité au cours de conservation à l'état réfrigéré, il apparaît que l'âge des animaux a une influence significative pour les muscles dont la couleur est instable, l'instabilité tendant à croître avec l'âge. Par contre il semble difficile de relier les caractéristiques de stabilité de la couleur avec le type métabolique des muscles.

Mots-clés : *couleur, viande, bovins, âge, race.*

## Introduction

L'intensification de la production de viande bovine a conduit au développement de l'élevage de jeunes mâles non castrés ce qui permet d'exploiter au mieux le potentiel de croissance des animaux. Les bovins ainsi produits sont abattus dans une tranche d'âge comprise entre 12 et 20 mois pour laquelle les caractéristiques de composition des muscles de l'animal adulte ne sont pas atteintes, ce qui entraîne un certain nombre de différences au niveau des propriétés organoleptiques des viandes (GOUTEFONGEA, VALIN, 1978). Par ailleurs on constate que, sous le nom de jeunes bovins, sont abattus des animaux d'âges très variables, donc de caracté-

ristiques musculaires très différentes. Ceci explique la grande variabilité observée au niveau de ce type de production, variabilité qui peut être accentuée par les différences de précocité existantes entre les races.

Notre travail visait à préciser, pour les jeunes bovins de la race limousine, l'influence de l'âge à l'abattage sur les caractéristiques de coloration des viandes ainsi que sur la stabilité de la couleur de ces viandes en cours de conservation à l'état réfrigéré.

## Matériel et méthodes

Les animaux utilisés dans cette étude ont été élevés selon deux modes de production (ROBELIN *et al.*, 1977).

— Une production de mâles destinés à être abattus à l'âge de deux ans. Ces animaux ont passé deux étés au pâturage et ont été engraissés à partir de l'âge de 19 mois (nombre d'animaux étudiés : 5).

— Une production intensive de mâles et de femelles abattus respectivement aux âges de 9, 13, 16 et 19 mois pour les mâles, et 9, 13 et 24 mois pour les femelles (3 animaux par stade d'abattage).

En outre, à titre comparatif, l'appréciation des caractéristiques de couleur de la viande des animaux adultes de la race limousine a été réalisée à partir de quatre vaches de réforme abattues à l'âge de 7 ans.

Les carcasses de ces différents animaux ont été disséquées quatre jours après l'abattage. L'étude a porté sur les muscles suivants :

— *Longissimus dorsi* (LD),
— *Semi tendinosus* (ST)
— *Tensor fasciae latae* (TFL),
— *Diaphragma* (D),
— *Gluteus medius* (GM).

Les prélèvements sur ces différents muscles ont été réalisés comme suit :

— LD : entre la 6e et la 8e côte,
— ST : partie centrale de la moitié inférieure,
— TFL : 1/3 inférieur,
— D : muscle entier,
— GM : partie interne.

## Mesures physiques et chimiques

### *Mesures du pH*

Le pH est mesuré sur broyat de viande à l'aide d'un pH mètre Radiometer, muni d'une électrode duplex.

*Mesure de la teneur en pigment*

Les pigments totaux ont été déterminés selon la méthode d'HORNSEY (1956) les résultats sont exprimés en µg de fer héminique par g de tissu frais.

*Mesures de la couleur*

A 4 jours *post mortem* des tranches de muscle de 2 cm d'épaisseur sont coupées perpendiculairement au grand axe des fibres musculaires, emballées sous film perméable et placées à + 2 °C pendant 18 heures. A l'issue de cette conservation, le spectre de réflexion est déterminé contre un blanc de sulfate de baryum entre 400 et 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DGBT équipé d'une sphère intégratrice. A partir de viandes en barquettes sous film perméable, le spectre de réflexion est déterminé également, d'une part, après chauffage pendant 5 heures à 30 °C (test de dénaturation) et, d'autre part, après un stockage de 8 jours à + 2 °C. Les valeurs de réflectance sont traitées selon les normes C.I.E. 1931 (WYSZECKI et STILES 1967) par rapport à la source C.

## Résultats

I. — *Croissance et évolution de la teneur en pigment*

Il est bien établi que la teneur en myoglobine, le pigment de la viande, croît avec l'âge des animaux, en particulier dans la tranche d'âge étudiée (LAWRIE 1950). La figure 1 retrace l'évolution de la teneur en fer héminique par gramme de tissu frais. La faible teneur en hémoglobine résiduelle (5 p. 100 environ des pigments héminiques totaux) entraîne généralement l'assimilation du fer héminique total à la teneur en myoglobine (HAMM, BUENNIG 1972). On constate tout d'abord à partir de ces résultats, que l'augmentation de la teneur en fer héminique est particulièrement importante entre les âges de 9 et 16 mois, période au cours de laquelle les teneurs augmentent respectivement de 57 p. 100, 71 p. 100, 74 p. 100, 95 p. 100 et 162 p. 100, pour les muscles LD, GM, TFL, ST, et D. Au-delà de l'âge de 16 mois les accroissements de la teneur en pigment sont beaucoup plus lents.

La figure 1 met également en évidence une grande variabilité de la teneur en pigment entre muscles, différences que l'on peut sans doute relier aux types métaboliques des divers muscles. Compte tenu des résultats de LACOURT (1973) et de HUNT et HEDRICK (1977), les muscles de bovin que nous avons étudiés se classeraient selon leur type métabolique dans l'ordre suivant, du plus anaérobie au plus aérobie : TFL; LD et GM; D, la partie du muscle ST prélevée étant comparable au muscle TFL (HUNT et HEDRICK 1977). On retrouve ce classement au niveau des teneurs en pigment. Ainsi à l'âge de 16 mois entre les groupes TFL et ST d'une part et LD, GM d'autre part, on enregistre une différence de l'ordre de 34 p. 100 de teneur en pigment et entre LD, GM et le muscle D l'écart est de 39 p. 100. Cette variabilité entre muscles semble supérieure à celle existante entre animaux de même âge pour un muscle donné puisque cette dernière avoisine 10 p. 100 pour LD, GM et TFL et ne s'élève qu'à 13 et 18 p. 100 pour D et ST respectivement.

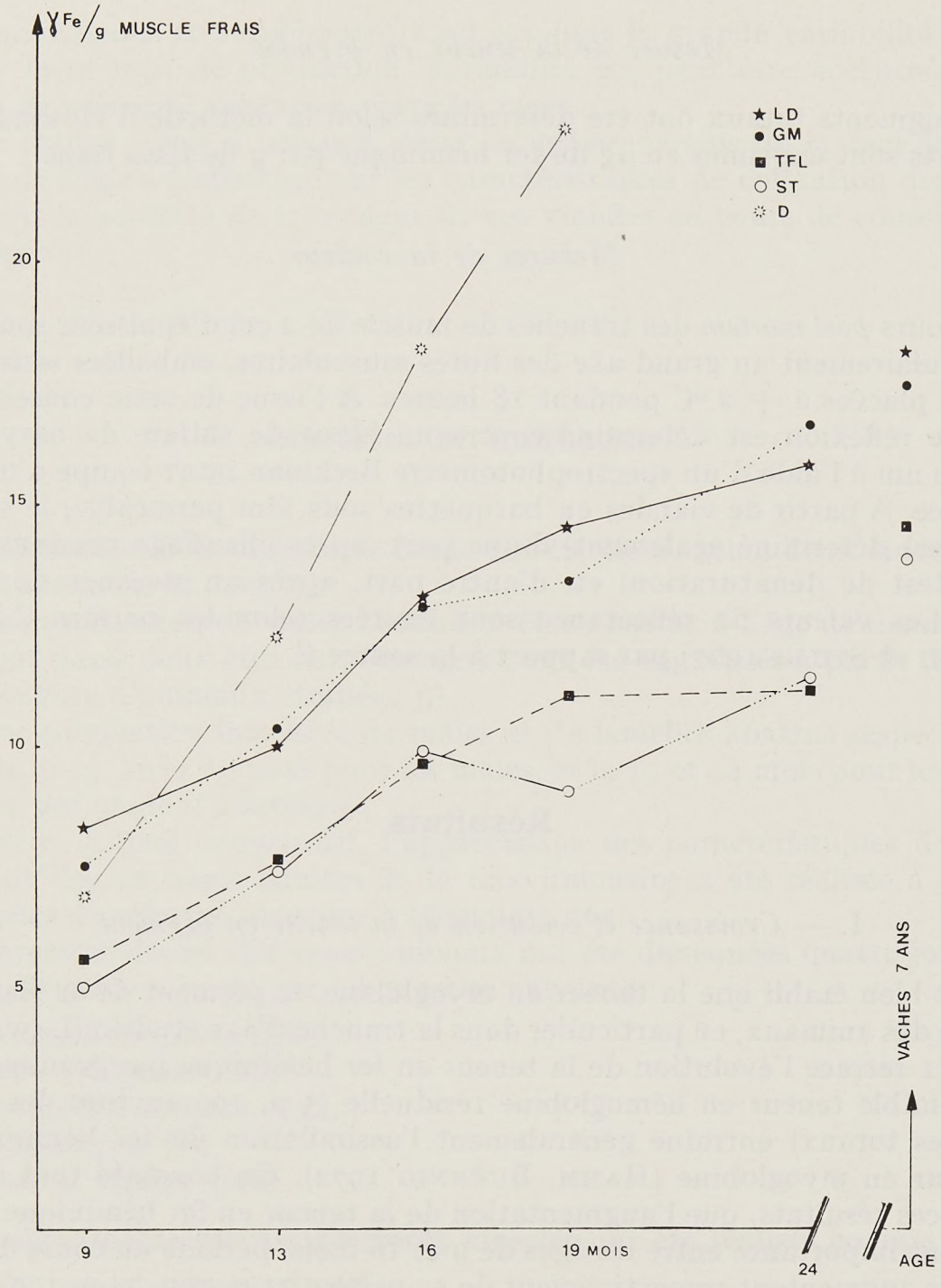



FIG. 1. — *Influence de l'âge sur la teneur en fer heminique.*

Dans la phase de croissance entre 9 et 24 mois la teneur en pigment est reliée étroitement et significativement à l'âge des animaux et au poids des muscles. L'analyse des relations âge/teneur en pigment à poids de muscle constant et poids de muscle/teneur en pigment à âge constant révèle que l'âge est le principal facteur qui influe sur la teneur en pigment (tabl. 1).

Enfin la représentation en coordonnées logarithmiques de l'évolution de la teneur en pigment du muscle en fonction de l'âge de l'animal indique, pour la tranche d'âge comprise entre 9 et 24 mois, que les femelles présentent une augmentation plus rapide de la teneur en pigment que les mâles ce qui traduit sans doute leur plus grande précocité (tabl. 2). La différence est d'autant plus nette que les muscles sont plus colorés.

TABLEAU I

*Influences respectives de l'âge et du poids des muscles sur la teneur en pigment*

| Corrélations | LD | TFL | ST | D |
|---|---|---|---|---|
| Pigment/poids | 0,69 | 0,73 | 0,62 | 0,70 |
| Pigment/âge | 0,83 | 0,78 | 0,71 | 0,77 |
| Poids/âge | 0,93 | 0,96 | 0,93 | 0,94 |
| Pigment/Poids à âge constant | 0,38 NS | 0,12 NS | 0,15 NS | 0,09 NS |
| Pigment/âge à poids constant | 0,70 $P < 0,01$ | 0,44 $P < 0,05$ | 0,45 $P < 0,05$ | 0,47 $P < 0,05$ |

TABLEAU 2

*Pente de la droite de régression du log de la teneur en pigment en fonction du log de l'âge*

| | LD | GM | TFL | ST |
|---|---|---|---|---|
| Mâles | 0,38 | 0,55 | 0,58 | 0,59 |
| Femelles | 0,66 | 1,03 | 0,62 | 0,64 |

## II. — *Relation entre la teneur en pigment et les caractéristiques de couleur de la viande*

Pour une même teneur en pigment, la valeur du pH (Stewart *et al.* 1965), le temps *post mortem* (Mac Dougall et Rhodes 1972) et le mode de conditionnement (Valin, Sornay, 1975) influent considérablement sur les caractéristiques de couleur mesurées par réflectomètrie. Il y a donc lieu de standardiser le temps de la mesure, le mode de conditionnement et de vérifier que les mesures sont effectuées sur des viandes de pH comparables si on veut analyser l'influence de l'évolution de la teneur en pigment avec l'âge sur les caractéristiques de couleur de la viande. On peut constater une grande homogénéité des valeurs de pH mesurées sur les animaux expérimentaux quel que soit le muscle étudié et tous âges confondus, aucun effet âge n'ayant pu être mis en évidence (tabl. 3).

### 2.1. — *Relation entre la teneur en pigment et les caractéristiques de couleur*

Pour apprécier les différences de couleur qui correspondent à l'évolution de la teneur en pigment observée au cours de la croissance, on peut examiner les relations qui existent entre la teneur en myoglobine et les caractéristiques de luminosité Y et de chromaticité telles que la longueur d'onde dominante $\lambda$ d la pureté d'excitation Pe et la composante rouge (tabl. 4).

TABLEAU 3

*Valeurs des pH mesurés 4 jours* post-mortem
*sur l'ensemble des muscles de jeunes bovins mâles et des vaches de réforme*

| Ages | Muscles | | | |
|---|---|---|---|---|
| | LD | GM | ST | TFL |
| 9 mois | 5,54 ± 0,03 | 5,56 ± 0,09 | 5,68 ± 0,22 | 5,61 ± 0,09 |
| 13 mois | 5,57 ± 0,03 | 5,50 ± 0,11 | 5,58 ± 0,08 | 5,60 ± 0,04 |
| 16 mois | 5,62 ± 0,03 | 5,57 ± 0,03 | 5,55 ± 0,00 | 5,62 ± 0,02 |
| 19 mois | 5,55 ± 0,05 | 5,47 ± 0,05 | 5,56 ± 0,08 | 5,57 ± 0,12 |
| 24 mois | 5,61 ± 0,05 | 5,56 ± 0,05 | 5,58 ± 0,03 | 5,60 ± 0,06 |
| 7 ans (vaches) | 5,53 ± 0,07 | 5,48 ± 0,08 | 5,52 ± 0,04 | 5,55 ± 0,09 |
| Valeurs moyennes | 5,57 ± 0,05 | 5,52 ± 0,08 | 5,58 ± 0,10 | 5,59 ± 0,07 |

TABLEAU 4

*Relations entre la teneur en pigment et les caractéristiques de la couleur des viandes*

| Muscles | Y/Mb | | $\lambda_d$/Mb | | Pe/Mb | | $x$/Mb | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $r$ | Signif. | $r$ | Signif. | $r$ | Signif. | $r$ | Signif. |
| LD | 0,93 | $P < 0,01$ | 0,91 | $P < 0,01$ | 0,54 | $P < 0,01$ | 0,74 | $P < 0,01$ |
| GM | 0,76 | $P < 0,01$ | 0,35 | NS | 0,35 | NS | 0,51 | $P < 0,05$ |
| ST | 0,43 | NS | 0,43 | NS | 0,35 | NS | 0,43 | NS |
| TFL | 0,73 | $P < 0,01$ | 0,38 | NS | 0,72 | $P < 0,01$ | 0,76 | $P < 0,01$ |

Y : luminosité.
$\lambda_d$ : longueur d'onde dominante.
Pe : Pureté d'excitation.
$x$ : composante rouge.

L'augmentation de la teneur en pigment affecte d'une façon importante la luminosité. Au niveau des caractéristiques de chromaticité on note un effet significatif surtout pour la composante rouge. Dans la gamme de teneur en pigment considérée l'influence de l'âge affecte peu la couleur du muscle *Semi tendinosus*.

### 2.2. *Relation entre l'âge des animaux et les caractéristiques de coloration de la viande*

Pour les animaux étudiés on constate qu'au-delà de l'âge de 16 mois, bien que la teneur en pigment augmente encore, il n'y a plus d'évolution significative ni de la luminosité ni de la composante rouge (fig. 2 et 3). Par contre, après cuisson (deux minutes dans l'huile à 120 °C) la valeur de la luminosié n'atteint un palier que pour les animaux âgés de 19 mois (tab. 5) .

## III. — *Influence de l'âge des animaux sur la stabilité de la couleur des viandes*

### 3.1. *Mesure de la stabilité de la couleur*

La stabilité de la couleur peut s'apprécier à partir du calcul d'une différence de couleur $\Delta E$ calculée dans le système C.I.E. 1931. On peut également chiffrer plus spécifiquement l'apparition de la forme oxydée du pigment de la viande en mesurant la différence de réflectance observée aux longueurs d'ondes de 630 et 580 nm (Strange *et al.*, 1974). Ces deux modes d'expression de l'évolution de la

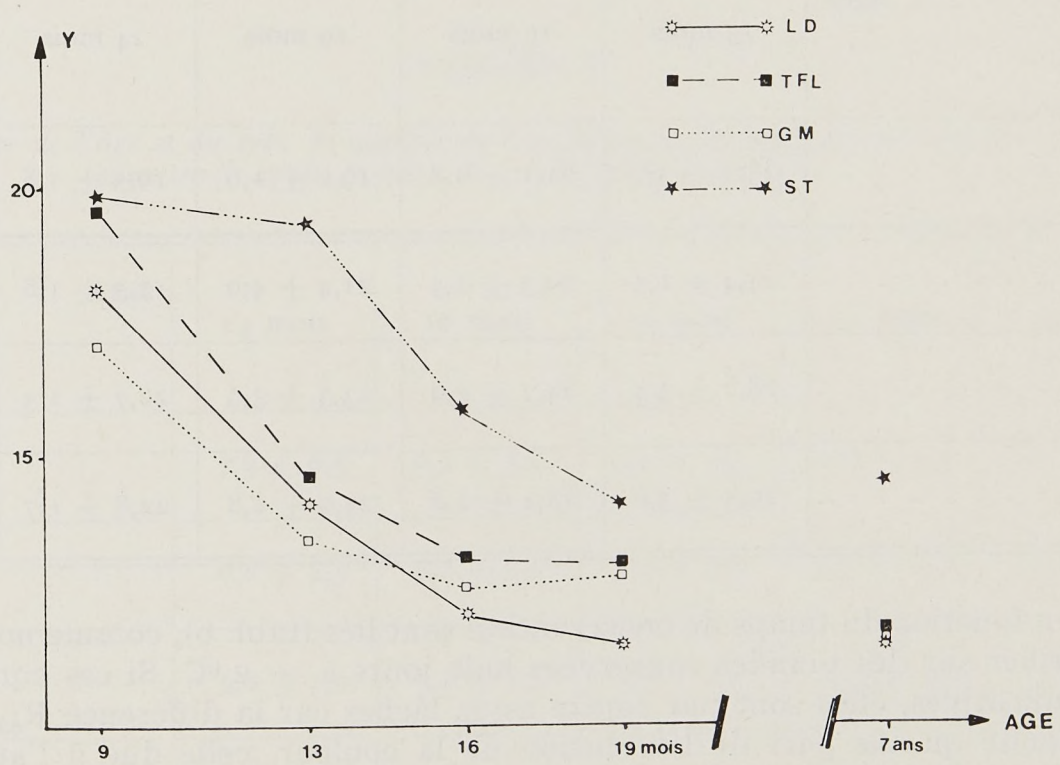



Fig. 2. — *Influence de l'âge sur la luminosité de la couleur de la viande.*

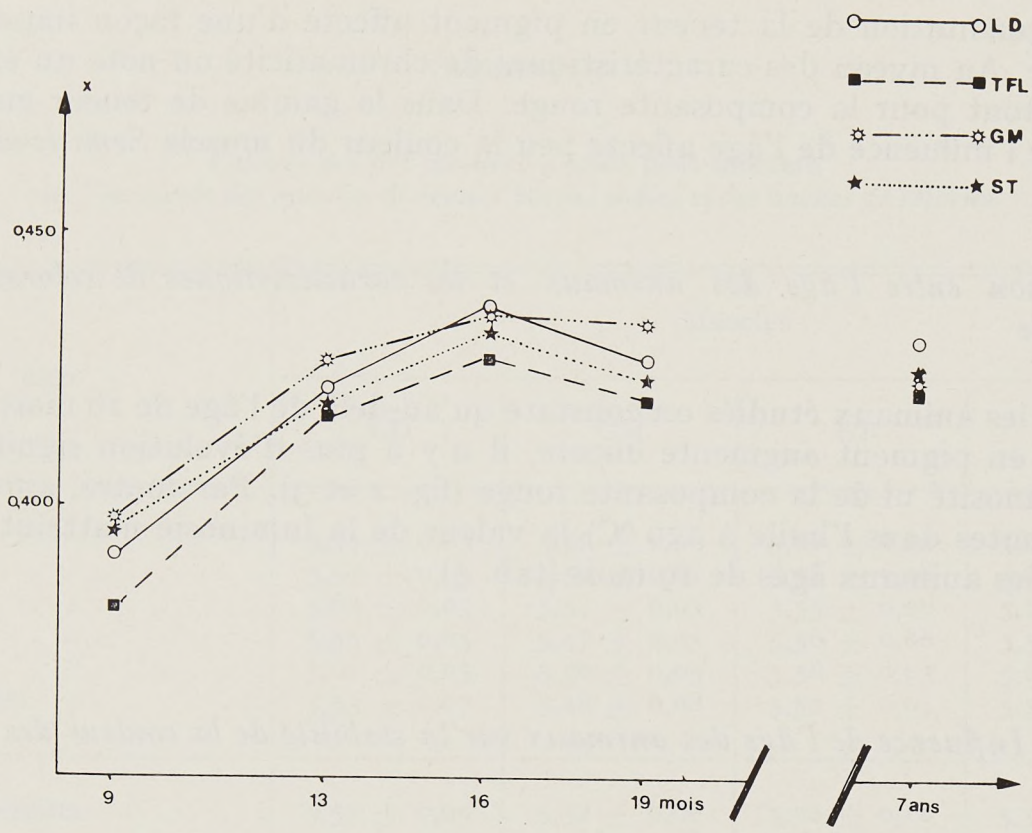



FIG. 3. — *Influence de l'âge sur la composante rouge de la couleur de la viande.*

TABLEAU 5

*Évolution en fonction de l'âge de la luminosité Y de la viande cuite*

| Muscles \ Ages | 13 mois | 16 mois | 19 mois | 24 mois | Vaches |
|---|---|---|---|---|---|
| LD | 25,2 ± 3,7 | 21,1 ± 1,8 | 19,6 ± 1,6 | 19,5 ± 1,8 | 18,6 |
| GM | 24,4 ± 1,5 | 20,3 ± 2,3 | 21,4 ± 4,0 | 17,5 ± 1,8 | 17,3 |
| TFL | 28,2 ± 3,4 | 24,7 ± 2,9 | 23,3 ± 3,9 | 22,7 ± 1,3 | 19,9 |
| ST | 29,5 ± 3,6 | 28,1 ± 2,8 | 24,9 ± 2,8 | 22,8 ± 1,7 | 22,2 |

couleur en fonction du temps de conservation sont liés (tabl. 6), comme nous avons pu le vérifier sur des viandes conservées huit jours à + 2 °C. Si ces corrélations sont significatives, elles sont par contre assez lâches car la différence $R_{630} - R_{580}$ n'appréhende qu'une part de l'évolution de la couleur, celle due à l'apparition de metmyoglobine, alors que le calcul de $\Delta E$ prend en compte les modifications de tout le spectre de réflexion enregistré entre 400 et 700 nm.

TABLEAU 6

*Relation entre la différence de couleur Δ E mesurée dans le système C.I.E. (1931) et la différence des réflectances mesurées à 630 et 580 nm*

| Muscles | LD | GM | TFL | ST |
|---|---|---|---|---|
| . . . . . | 0,61 | 0,60 | 0,72 | 0,50 |
| Seuil de signification de *r* . . . . . | $P < 0,01$ | $P < 0,01$ | $P < 0,001$ | $P < 0,01$ |

3.2. *Conservation à + 2 °C*

La viande provenant des animaux expérimentaux, conditionnée sous film perméable 4 jours après l'abattage, puis conservée 8 jours à + 2 °C, a présenté une très grande stabilité de couleur. Après 8 jours de conservation la valeur de $R_{630} - R_{580}$ est pratiquement toujours supérieure à 20 ce qui correspond à une teinte acceptable (STRANGE *et al.*, 1974). Seul le muscle *Gluteus médius* chez les animaux les plus âgés (24 mois et au-delà) manifeste une moindre stabilité de la couleur ($R_{630} - R_{580}$ de l'ordre de 15 après 8 jours de conservation).

Exprimée en termes de différences de couleur ΔE dans le système C.I.E. 1931, l'évolution enregistrée est également très faible (tabl. 7). Dans ce système la plus

TABLEAU 7

*Influence de l'âge et du type de muscle sur l'évolution de la différence de couleur (Δ E) enregistrée après 8 jours de conservation à + 2 °C*

| Ages / Muscles | 13 mois | 16 mois | 19 mois | 24 mois | vaches |
|---|---|---|---|---|---|
| LD . . . . . | 7,9 ± 6,5 | 6,5 ± 5,7 | 4,4 ± 1,5 | 6,1 ± 4,6 | 10 ± 9 |
| GM . . . . . | 6,8 ± 2,5 | 6,8 ± 4,1 | 7,9 ± 4,6 | 12,2 ± 4,6 | 13,4 ± 6,9 |
| TFL . . . . . | 5,6 ± 1,9 | 5,1 ± 2,5 | 2,5 + 1,4 | 4,8 ± 2,8 | 4,3 ± 1,6 |
| ST . . . . . | 10,2 ± 6,1 | 7,3 ± 3,5 | 5,8 ± 2,0 | 10,5 ± 9,7 | 6,4 ± 1,3 |

petite différence de couleur perceptible par un observateur standard correspond à un $\Delta$ E de 2.

On ne peut mettre en évidence une influence de l'âge des animaux sur la stabilité de la couleur que dans le cas du muscle *Gluteus medius* ($r = 0{,}66$; $P < 0{,}001$).

### 3.3. *Test de dénaturation thermique*

Afin de révéler des différences potentielles de stabilité de la couleur entre les muscles étudiés, nous avons mis en œuvre le test de dénaturation thermique de Hood (1971). Ce test consiste, après oxygénation de la viande, à conserver cette dernière, emballée sous film perméable, dans une ambiance à + 30 °C pendant 5 heures puis à mesurer l'influence du traitement sur la couleur.

En appréciant la stabilité de la couleur à travers les valeurs prises par le rapport $\frac{\Delta 1 - \Delta 2}{\Delta 1}$ ($\Delta 1 = R_{630} - R_{580}$ avant chauffage et $\Delta 2$ après le chauffage à 30 °C) on constate des différences de stabilité de couleur entre muscles ainsi qu'un effet de l'âge sur cette caractéristique (tabl. 8).

TABLEAU 8

*Influence de l'âge et du type de muscle sur la stabilité de la couleur de la viande stockée à 30 °C. pendant 5 h. Les moyennes affectées d'indices différents sont significativement différentes au seuil 5 p. 100 (24 mois)*

| Ages / Muscles | 13 mois | 16 mois | 19 mois | 24 mois |
|---|---|---|---|---|
| LD | 0,21 ± 0,14 | 0,39 ± 0,07 | 0,37 ± 0,07 | $0{,}37^{a}$ ± 0,07 |
| GM | 0,32 ± 0,12 | 0,38 ± 0,07 | 0,41 ± 0,12 | $0{,}59^{b}$ ± 0,16 |
| TFL | 0,34 ± 0,18 | 0,36 ± 0,04 | 0,32 ± 0,05 | $0{,}37^{a}$ ± 0,06 |
| ST | 0,31 ± 0,07 | 0,35 ± 0,10 | 0,42 ± 0,15 | $0{,}43^{ab}$ ± 0,14 |

$\frac{\Delta 1 - \Delta 2}{\Delta 1} = 0$ pour un muscle parfaitement stable.

Dans un muscle instable $\Delta 2 \rightarrow 0$ et le rapport $\rightarrow 1$.

Pour les animaux abattus à l'âge de 24 mois on observe un classement des muscles comparable à celui obtenu par HOOD (1971) dans le cas de génisses de même âge; du plus stable au moins stable :

$$LD = TFL > ST > GM$$

Les différences enregistrées dans cette étude semblent toutefois moins importantes que celles rapportées par HOOD. Dans le cas des taurillons limousins à l'âge de 24 mois seule la stabilité de la couleur du muscle GM est significativement différente de celles de LD et TFL ($P < 0,05$). Pour le muscle ST par rapport à LD et TFL on n'observe qu'une tendance ($P < 0,10$).

L'âge n'a pas d'influence sur les muscles stables (LD, TFL) mais il affecte par contre significativement l'instabilité de la couleur des muscles ST et GM (tab. 9).

TABLEAU 9

*Influence de l'âge sur la stabilité de la couleur*

| Muscles | Corrélations entre la stabilité de la couleur et l'âge des animaux | |
|---|---|---|
| LD . . . . | $r = 0,02$ | NS |
| GM . . . . | $r = 0,57$ | $P < 0,005$ |
| TFL. . . . | $r = 0,21$ | NS |
| ST . . . . | $r = 0,40$ | $P < 0,05$ |

## Discussion et conclusion

Cette étude nous a permis de mieux préciser l'influence de l'âge des animaux sur le déterminisme de la couleur des viandes bovines.

Sur le plan de l'évolution de la teneur en pigment il était bien établi que la teneur en myoglobine augmentait avec l'âge des animaux (LAWRIE, 1950). Cependant il apparaît ici que cette augmentation n'est pas régulière tout au long de la période de croissance intensive étudiée, entre 9 et 19 mois. L'essentiel de l'augmentation de la teneur en pigment se produit entre les âges de 9 et 16 mois. Quand on compare l'évolution de la teneur en pigment et le développement pondéral de la musculature des mêmes animaux (ROBELIN *et al.*, 1977), on constate que si entre 9 et 16 mois le rythme mensuel moyen d'augmentation de la teneur en

pigment est pratiquement constant pour un muscle donné, la vitesse de développement des masses musculaires, par contre, diminue en moyenne de 30 p. 100 entre 13 et 16 mois par rapport à la période antérieure. Cette diminution est voisine de 22 p. 100 pour l'ensemble des muscles dorsaux et de 25 p. 100 pour les muscles de la cuisse comme il apparaît sur le tableau 10.

TABLEAU 10

*Évolution de la teneur en pigment et du poids de muscle avec l'âge*

| | | Évolution relative mensuelles moyenne entre | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 9-13 mois | 13-16 mois | 16-19 mois |
| Teneur en pigment | LD | 0,05 | 0,10 | 0,04 |
| | GM | 0,095 | 0,08 | 0,02 |
| | TFL | 0,09 | 0,095 | 0,05 |
| | D | 0,19 | 0,16 | 0,09 |
| Masses (*) musculaires | Musculature totale | 0,13 | 0,09 | 0,06 |
| | Ensembles muscles dorsaux | 0,12 | 0,09 | 0,03 |
| | Ensemble muscles memb. postérieur | 0,08 | 0,06 | 0,05 |

(*) Résultats calculés à partir des données de ROBELIN *et al.* 1977.

Au-delà de l'âge de 16 mois, sur la viande crue, il n'est pas possible de mettre en évidence une évolution significative des caractéristiques de couleur mesurées par réflectométrie, le lent accroissement de la teneur en pigment au-delà de cet âge n'influe pas significativement sur les caractéristiques de luminosité de la viande. Par contre ce n'est qu'au-delà de 19 mois que l'on n'observe plus d'évolution de la couleur de la viande cuite. Il convient de noter que dans la période 16—19 mois des remaniements importants affectent la composition des muscles; c'est au cours de cette période en particulier que l'on enregistre une forte augmentation de la teneur en lipides intramusculaires (VALIN, GOUTEFONGEA, en préparation).

Outre l'âge, le sexe a une influence sur l'évolution de la teneur en pigment qui croît plus rapidement chez les femelles, plus précoces que les mâles. Enfin, on peut éliminer semble-t-il toute influence du poids du muscle sur la teneur en pigment à âge constant, tout au moins dans la tranche d'âges étudiée.

Finalement pour les taurillons élevés dans des conditions de croissance intensive on observe une succession de modifications profondes de la composition des muscles. Après la vague de synthèse du collagène observée entre 9 et 19 mois lorsque les animaux atteignent leur maturité sexuelle (GEAY *et al.*, 1975), la quantité totale de pigment augmenterait plus rapidement puis les lipides intrasmusculaires se déposeraient. La détermination d'un âge optimal d'abattage qui concilierait les impératifs d'une production économique avec la recherche d'une viande

de qualité ne peut se faire sans tenir compte des caractéristiques du développement des différents composants de la structure musculaire.

En ce qui concerne la stabilité de la couleur des viandes de taurillon en cours de conservation à l'état réfrigéré, les résultats obtenus corroborent nos observations antérieures (VALIN, SORNAY, 1975). Lorsque ces viandes ont un pH normal c'est-à-dire inférieur à 6, ce qui était le cas des viandes étudiées, la couleur est stable. Dans les conditions de conservation utilisées, l'évolution de la couleur se traduit par une tendance à la diminution de la luminosité Y, ce que Mac DOUGALL et RHODES (1972) avaient déjà observé. Par contre, nous n'avons pas retrouvé l'augmentation de la saturation notée par ces auteurs. La pureté d'excitation reste stable, voire décroîtrait significativement lors du test de chauffage à 30 °C. Ce résultat va de pair avec les tendances à la décroissance de la composante rouge x et à l'augmentation de la composante jaune y. Ce résultat est tout à fait comparable à celui rapporté antérieurement par Mac DOUGALL (1971).

Quant aux facteurs qui peuvent intervenir sur la stabilité de la couleur là encore il apparaît que l'âge joue un rôle important, au moins au niveau des muscles dont la couleur est peu stable et dont l'instabilité croîtrait avec l'âge. Ce résultat ne semble pas avoir été rapporté antérieurement.

Par ailleurs il semble difficile de relier stabilité de la couleur et type métabolique des muscles. On pourrait penser que le type rouge (métabolisme oxydatif) va de pair avec une certaine instabilité de la couleur. Ainsi le *m. Psoas major* et le *m. Diaspragma* sont des muscles dont la couleur est relativement instable. A l'opposé le *m. Tensor fasciae latae* se révèle être un muscle à couleur très stable et il s'agit chez le bovin d'un muscle à métabolisme énergétique de type anaérobie marqué (LACOURT, 1973). Cependant si on compare le *m. Longissimus dorsi* avec le *m. Gluteus medius*, leurs caractéristiques de stabilité de couleur sont très différentes alors que sur les plans métaboliques et contractiles ces muscles sont très proches (HUNT et HEDRICK, 1977). Ils sont également tout à fait comparables quant à leur teneur en pigment, au moins pour nos animaux expérimentaux. Les mécanismes responsables de la stabilité de la couleur en cours de conservation nous sont encore largement inconnus, ces éléments de discussion montrent la complexité de ce problème.

*Reçu pour publication en octobre 1979.*

NB. : Une partie des résultats mentionnés dans cette étude a déjà été présentée au 22e Congrès Européen des chercheurs en viande, Malmoe 1976.

## Summary

*Influence of age on color characteritics of Young bulls meat (Limousin breed)*

In young bulls of the limousin breed growing intensively, the major increase of the myoglobin concentration occurs between 9 and 16 months. Beyond this point, further increase of the myoglobin content does not significantly affects the color characteristics of raw meat.

Age and sex are the main factors affecting the rate of increase of myoglobin concentration, but the carcass weight has no significant effect in these conditions without any compensatory growth.

About color characteristics and particularly color stability of chilled meat, the age of animals significantly affects the muscles exhibiting a short shelflife such as *m. Gluteus medius* and m. *Semitendinosus*. The colour instability of these muscles increases with age.

Apart from the effect of age it seems difficult to find any close relation between the characteristics of colour stability and metabolic types of muscle fibres.

## Références bibliographiques


GEAY Y., ROBELIN J., BOCCARD R., 1975. Caractéristiques d'engraissement des bovins limousins : Cas des jeunes bovins. *Bull. Tech. C.R.Z.V.*, Theix, I.N.R.A., **22,** 29-40.

HAMM R., BUENNIG K., 1972. Myoglobin, hemoglobin and iron in bovine and porcine muscle. 18 th Meeting of Europ. Meat Res. Workers-Guelph, vol. I 156-161.

HOOD D. E., 1971. Factors affecting the accumulation of metmyoglobin in prepackaged beef. 17th Europ. Meeting of Meat Res. Workers, Bristol.

HORNSEY K. C., 1956. The colour of cooked cured pork. I. — Estimation of the nitrite oxide haem pigment. *J. Sci. Food Agric.*, **7,** 534-540.

HUNT M. C., HEDRICK H. B., 1977. Profile of fiber types and related properties of five bovine muscles. *J. Food Sci.*, **42,** 513-517.

LACOURT A., 1973. Evolution avec l'âge des caractéristiques métaboliques et contractiles des muscles de bovins. 19th Europ. Meeting of Meat Res. Workers—Paris, **1,** 417-433.

Mac DOUGALL D. B., 1971. Reflectance spectra and colour of beef packed in different concentrations of oxygen. 17th Europ. Meeting of Meat Res. Workers—Bristol.

Mac DOUGALL D. B., RHODES D. N., 1972. Characteristics of the appearance of Meat. III. — Studies on the colour of meat from young bulls. *J. Sci. Food Agric.*, **23,** 637-647.

MALTERRE C., BOCCARD R., COTENCIN M., 1974. Influence du poids d'abattage sur la composition de la carcasse et les qualités de la viande de taurillons limousins. *Bul. Tech. C.R.Z.V.*, Theix, I.N.R.A., **17,** 57-61.

ROBELIN J., GEAY Y., BERANGER C., 1977. Evolution de la composition corporelle des jeunes bovins mâles entiers de race limousine entre 9 et 19 mois. I Composition anatomique. *Ann. Zootech.*, **26,** (4) 533-546.

STEWART M. R., ZIPSER M. N., WATTS B. M., 1965. The use of reflectance spectrophotometry for the assay of raw meat pigments. *J. Food Sci.*, **30,** 464-467.

STRANGE E. D.. BENEDICT R. C., GUGGER R. E., METZGER V. G., SWIFT C. E., 1974. Simplified methodology for measuring meat colour. *J. Food Sci.*, **39,** 988-992.

VALIN C., SORNAY J., 1975. Contribution à l'étude de la couleur des viandes de taurillon. Plaquette I.T.E.B. — Section Viande.

WYSZECKI G., STILES W. S., 1967. Color Science. John Wiley and Sons Inc., New York.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (3), 333-343.

# Application de la méthode de Ling au dosage de l'acide lactique dans les viandes

Michèle AYROULET-MARTIN et Jeanne FOURNAUD

*Laboratoire de recherches sur la Viande*
*Centre national de Recherches zootechniques, I.N.R.A.,*
*78350 Jouy-en-Josas*

## Résumé

Nous avons essayé d'appliquer la méthode proposée par LING au cas des viandes et des produits à base de viande. Les essais que nous avons réalisés ont fait apparaître que cette méthode pouvait, après quelques modifications, s'adapter au cas des viandes et des produits carnés. Les principales étapes en sont les suivantes :

L'acide lactique est extrait après 10 min à 100 °C. Les protéines sont précipitées par NaOH — $ZnSO_4$ en présence de $BaCl_2$. L'acide lactique est alors dosé par colorimétrie en présence de $FeCl_3$ à 425 nm. Les études ont montré qu'une partie de l'acide lactique restait adsorbée à la viande. Nous avons dû établir une courbe standard pour déterminer les concentrations en acide lactique à partir des densités optiques obtenues.

Dans 95 p. 100 des cas étudiés la méthode proposée donne de meilleurs résultats que la méthode selon BARKER-SUMMERSON.

Mots-clés : *viande, acide lactique, dosage, colorimétrie.*

## Introduction

Après la mort de l'animal, le glycogène de la viande est dégradé sous l'action des enzymes du muscle. Il s'accumule de l'acide lactique dont la concentration peut varier selon l'état physiologique de l'animal à l'abattage. D'autre part, au cours de la transformation de la viande, des bactéries telles les bactéries lactiques et, en particulier les lactobacilles, conduisent à la formation d'acide lactique. Or, d'après JENSEN (1951), les acides et certains de leurs sels pourraient être responsables, dans certains cas, du verdissement que l'on observe sur les produits de charcuterie, en particulier sur les tranches de jambon après la coupe et ce, en dehors de tout développement microbien sur ces tranches.

Le dosage de l'acide lactique endogène et celui résultant d'un développement

microbien, s'avère donc opportun aussi bien dans la viande en l'état que dans les produits de charcuterie (jambon, saucisson sec).

Deux méthodes colorimétriques peuvent être utilisées :

— La méthode classique selon BARKER-SUMMERSON (1941). L'acétaldéhyde formé par l'oxydation de l'acide lactique après addition d'acide sulfurique concentré et chaud est dosé par le parahydroxydiphényle en présence d'ions cuivriques.

— La méthode selon LING (1951) principalement utilisée dans le cas du lait. A pH neutre l'acide lactique forme avec le chlorure ferrique un complexe " lactate-fer " dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en acide lactique.

On peut aussi employer des méthodes enzymatiques. Elles reposent sur l'oxydation de l'acide lactique en présence de lacticodéshydrogénase, LDH, par la nicotinamide adénine dinucléotide oxydée ($NAD^+$). La méthode selon KUBOWITZ et OTT (1943) citée par SZYLIT (1973) dose le NADH, $H^+$ formé, celle selon STETTER et KANDLER (1973) consiste à réoxyder le NADH, $H^+$ par la diaphorase, en présence de bleu méthylène comme accepteur d'électrons.

La méthode selon BARKER-SUMMERSON impose de très nombreuses contraintes au niveau des manipulations. Aussi avons-nous essayé d'appliquer et d'adapter au cas des viandes et des produits carnés transformés la méthode selon LING, qui apparemment, ne présente pas autant de difficultés. Nous l'avons ensuite comparée à la méthode de référence selon BARKER-SUMMERSON ainsi qu'à des méthodes enzymatiques.

## Matériel et méthodes

### *Origine et préparation des échantillons*

Les échantillons utilisés sont des viandes de bœuf, porc, veau, volailles, ainsi que des saucissons secs à différents stades de maturation.

Les prises d'essai d'au moins 10 g sont pesées précisément dans un flacon puis diluées au 1/10 avec de l'eau distillée. Le broyage est ensuite effectué à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turrax pendant 3 minutes à 20 000 t/mn. Le flacon contenant le broyat est soumis à un passage de 10 min. dans un bain-marie bouillant après avoir été muni d'un ludion afin d'éviter les pertes par évaporation. Cette manipulation permet l'extraction de l'acide lactique.

Après refroidissement l'extrait obtenu est filtré sur filtre sans cendre (DURIEUX). Ce filtrat dit « Filtrat 1 » sera utilisé après défécation pour le dosage colorimétrique.

### *Technique de défécation*

Dans une fiole jaugée de 100 ml sont introduits successivement : 10 ml de filtrat 1,10 ml d'une solution de chlorure de baryum à 0,404 M, 5 ml de soude 0,66 M et 5 ml d'une solution de sulfate de zinc à 0,783 M.

Ce mélange, complété à 100 ml avec de l'eau distillée, est agité vigoureusement et filtré sur filtre sans cendre (DURIEUX).

A l'aide d'une solution aqueuse de bleu de bromothymol 0,025 M, NaOH 0,0015 M, il est vérifié sur des parties aliquotes que l'acide lactique de ce filtrat obtenu (Filtrat 2) est neutralisé, ceci pour que la couleur du complexe lactate-fer soit maximum.

### *Dosage colorimétrique*

*Réactif utilisé*

Solution de chlorure ferrique 0,062 M. Cette solution doit être préparée extemporanément.

*Mode opératoire*

2 ml de solution de chlorure ferrique sont ajoutés à 10 ml du filtrat (2).

Il apparaît une coloration jaune dont l'intensité est mesurée à 425 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman Model 25. Les lectures sont effectuées contre un blanc déféqué de la même manière que les échantillons.

### *Établissement des courbes utilisées pour le dosage colorimétrique*

Deux types de courbe sont établis :

*Courbe A ou courbe de référence*

Des volumes croissants d'une solution de lactate de lithium 0,0104 M, sont introduits dans des fioles jaugées de 100 ml. La technique de défécation et le dosage colorimétrique sont ensuite réalisés comme précédemment.

*Courbe B ou courbe standard*

Pour établir la courbe B, des surcharges de lactate de lithium sont ajoutées à des broyats de viande de façon à obtenir une dilution finale au 1/10 après addition d'eau distillée. L'ensemble est alors extrait 10 min. à chaud, déféqué puis filtré. Le blanc utilisé, dans ce cas, pour le dosage colorimétrique, est le filtrat (2) obtenu à partir du broyat de viande sans addition de lactate de lithium.

*Interprétation — Expression des résultats*

L'incidence du mode opératoire, l'éventuelle interférence de certaines substances et la comparaison des deux méthodes de dosage de l'acide lactique (selon BARKER-SUMMERSON et selon LING) sont analysées au moyen de différents tests statistiques.

## Résultats

### I. — *Application de la méthode selon* LING *au dosage de l'acide lactique dans les viandes*

1. *Établissement de la courbe A ou courbe de référence* (fig. 1)

Les volumes de la solution de lactate de lithium 0,0104 M que nous avons introduits dans 100 ml ont été de 0,0 — 2,5 — 5,0 — 7,5 — 10,0 ml. Ils correspondent respectivement à des concentrations en acide lactique de 0,25 — 0,50 — 0,75 — 1,00 g pour 100 ml d'eau distillée.

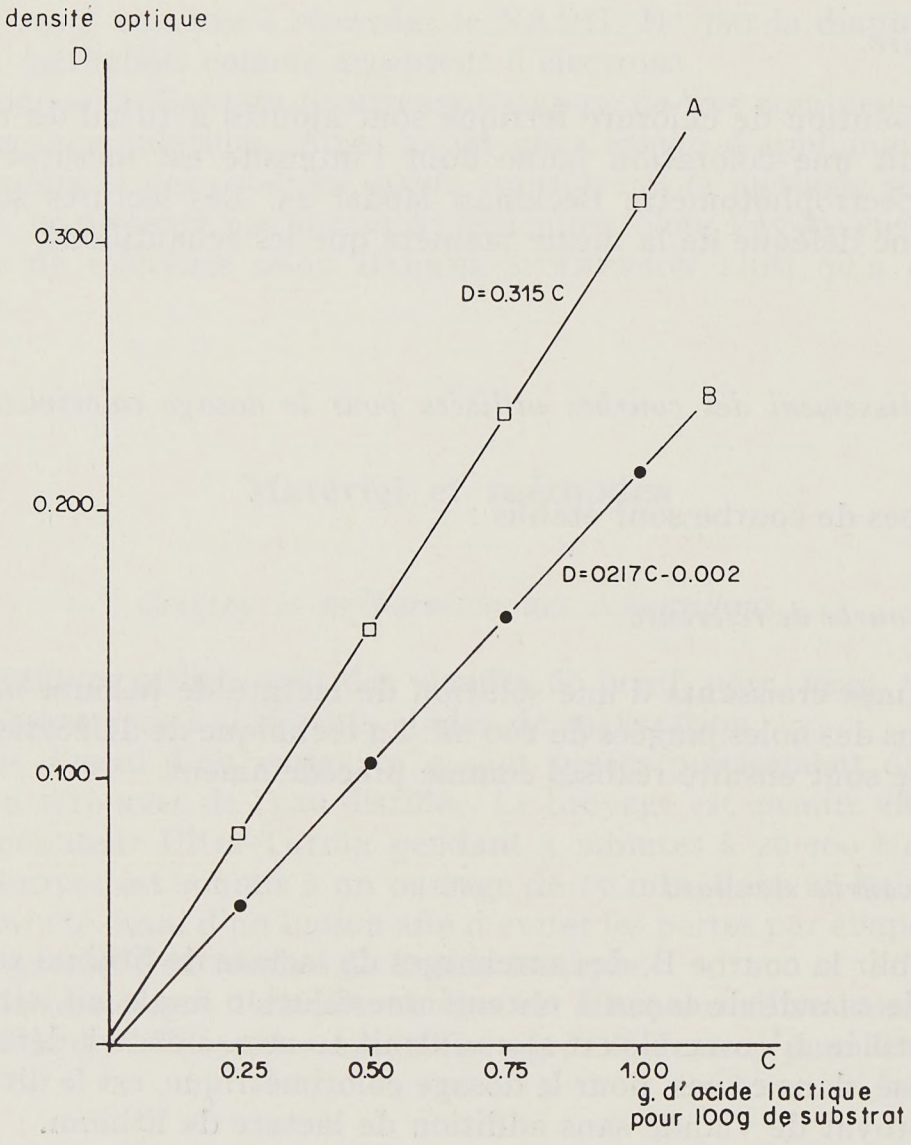



FIG. 1. — *Relation entre la teneur en acide lactique de l'échantillon et la densité optique.*
A : Courbe de référence : surcharges d'acide lactique dans de l'eau distillée.
B : Courbe standard : surcharges d'acide lactique dans un broyat de viande.

La courbe A montre que la relation entre la densité optique et la quantité d'acide lactique est linéaire.

Si C représente le pourcentage en acide lactique et D la densité optique, cette relation peut se mettre sous la forme D = 0,315 C ($r$ = 0,999) (fig. 1).

2. *Influence du mode d'extraction*

Afin de déterminer l'influence du mode opératoire sur la quantité d'acide lactique retrouvée, nous avons comparé, dans un premier temps, les techniques de séparation de l'extrait par filtration et par centrifugation. Ces opérations ont été effectuées sur des broyats de viande de porc munis d'une surcharge de 1 g d'acide lactique pour 100 g de viande. 15 échantillons de viande de porc, d'origines différentes, ont été ainsi traités.

Après nous être assurés que les deux populations avaient la même répartition par le test de HARTLEY, l'utilisation du test $t$ de STUDENT (pour des échantillons associés par paires) a permis de mettre en évidence qu'il n'existe pas de différences significative entre les deux méthodes de séparation de l'extrait ($t$ = 0,470, DDL = 14) (tabl. 1). Aussi, pour les dosages ultérieurs, seule la technique de filtration a été conservée à cause de sa rapidité et de sa facilité d'utilisation.

TABLEAU I

*Influence du mode d'extraction sur la quantité d'acide lactique retrouvée, dans le cas de viandes de porc*

a) *Comparaison Filtration-Centrifugation*

| | Filtration | Centrifugation | Différence Filtration-Centrifugation |
|---|---|---|---|
| Moyenne (*) | 0,2135 | 0,2124 | — 0,0040 |
| Écart type | 0,0198 | 0,0236 | 0,0327 |

(*) Les moyennes sont calculées sur 15 échantillons et exprimées en densité optique.

*Test de* STUDENT $t$ observé = 0,470, degré de liberté = 14.

*Test de* HARTLEY (degré de liberté = 14, nombre de populations = 2) :

$$H \text{ observé} = \frac{\text{Variance Maximum}}{\text{Variance minimum}} = 1{,}415 \text{ NS}$$

Dans un deuxième temps, nous avons comparé l'extraction à froid et l'extraction à chaud (10 mn à 100 °C) ; l'interprétation des résultats par analyse de la variance révèle qu'il existe une différence significative entre les rendements de ces deux traitements (P 0,05 ; Fobs = 5,71) (tabl. 2), la meilleure extraction étant celle effectuée à chaud.

Enfin, nous avons réalisé une cinétique d'extraction à chaud afin de déterminer le temps nécessaire, à la fois, à une extraction maximale et à l'obtention d'un

TABLEAU 2

*Influence du mode d'extraction sur la quantité d'acide lactique retrouvée, dans le cas de viandes de porc*

b) *Comparaison extraction à froid - extraction à chaud*

| Surcharge d'acide lactique en g/100 g de viande | Extraction à froid | | Extraction à chaud | |
|---|---|---|---|---|
| | Moyenne | Écart type | Moyenne | Écart type |
| 0,25 | 0,051 (*) | 0,003 | 0,056 | 0,003 |
| 0,50 | 0,107 | 0,013 | 0,110 | 0,005 |
| 0,75 | 0,162 | 0,012 | 0,160 | 0,008 |
| 1,00 | 0,206 | 0,017 | 0,227 | 0,007 |

(*) Les moyennes sont calculées sur 5 échantillons et exprimées en densité optique.

minimum de variabilité entre les répétitions. Sur des broyats de viande de porc (broyats témoins et broyats additionnés de surcharges) six temps de séjour à 100 °C ont été étudiés : 5, 10, 15, 20, 25 et 30 min. Pour chaque temps dix échantillons sont analysés. L'utilisation du test statistique de HARTLEY sur l'égalité de deux ou plusieurs variances a permis de mettre en évidence que l'ensemble des variances testées étaient homogènes (tab. 3). Le recours à l'analyse de la variance ne révèle aucune différence significative entre les différents temps de séjour à 100 °C.

TABLEAU 3

*Influence du mode d'extraction sur la quantité d'acide lactique retrouvée, dans le cas de viandes de porc*

c) *Cinétique d'extraction*

| Temps d'ébullition en minutes | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Moyennes (*) | 0,202 | 0,202 | 0,202 | 0,202 | 0,200 | 0,198 |
| Écart type | 0,0275 | 0,0265 | 0,0245 | 0,0230 | 0,0300 | 0,0295 |

(*) Les moyennes sont calculées sur 10 échantillons et exprimées en densité optique.

*Test de* HARTLEY (degré de liberté = 9, nombre de populations = 6) :

$$H \text{ observé} = \frac{\text{Variance Maximum}}{\text{Variance Minimum}} = 1{,}701 \text{ NS}$$

Il apparaît donc que le temps d'extraction à chaud n'a aucune influence sur la quantité d'acide lactique extraite ainsi que sur la variabilité entre les répétitions. Cette même conclusion s'applique également aux cas des viandes de bœuf et de volailles.

Dans des essais où des surcharges croissantes d'acide lactique ont été ajoutées à des viandes et malgré l'utilisation de ce mode d'extraction, on constate que l'on n'a pas pas pu retrouver la totalité de l'acide lactique mais qu'une partie reste adsorbée à la viande. Ceci nous conduit à utiliser non pas une courbe de référence sur eau, mais une courbe standard (surcharges croissantes sur broyat de viande) qui tient compte de ce phénomène, et à laquelle il faudra se référer par la suite.

### 3. — *Influence du type de viande sur la courbe B ou courbe standard*

Nous avons réalisé une courbe standard B sur des viandes issues de différentes espèces animales : porc, bœuf, veau, agneau, volailles. Pour chacune d'entre elles six répétitions ont été effectuées à partir de viande d'origine différente. Dans tous les cas testés on a pu établir qu'il existait une relation linéaire entre la densité optique D et le pourcentage d'acide lactique C. Pour chaque espèce animale, une équation de la droite standard a été calculée ainsi que le coefficient de corrélation (tabl. 4). L'observation des coefficients de corrélation (tous proches de 1) montre que les

TABLEAU 4

*Établissement de la courbe standard B pour différentes espèces animales*

| Espèces testées | Equations des droites de régression (*) $D = aC + b$ | Coefficient de corrélation ($r$) |
|---|---|---|
| Porc | $D = 0{,}235\ C - 0{,}005$ | + 0,990 |
| Bœuf | $D = 0{,}225\ C + 0{,}006$ | + 0,994 |
| Veau | $D = 0{,}214\ C - 0{,}004$ | + 0,974 |
| Agneau | $D = 0{,}219\ C - 0{,}131$ | + 0,934 |
| Volailles | $D = 0{,}193\ C + 0{,}007$ | + 0,905 |

(*) Chaque droite de régression est établie sur 6 échantillons de viande. 5 points ont été calculés pour chaque droite de régression.

(**) D = densité optique à 425 nm; C = concentration en acide lactique (g pour 100 g de viande).

*Régression linéaire moyenne :*

$$D = 0{,}217\ C - 0{,}002$$
$$r = 0{,}950$$

résultats sont très homogènes dans le cas du bœuf et du porc. Dans le cas des volailles, le coefficient de corrélation $r = 0{,}905$ peut s'expliquer par le fait que nous avons inclus dans cette population différentes espèces de volailles (canard, dinde, oie, poule). La comparaison des coefficients de régression par utilisation de l'analyse de la variance permet de mettre en évidence qu'il n'existe pas de différence significative entre les différents coefficients de régression, ce qui implique

que ces droites sont parallèles. Cette analyse fait aussi apparaître que la régression linéaire commune est très hautement significative (P = 0,01). L'équation de la droite standard commune peut s'écrire :

D = 0,217 G — 0,002 $r$ = + 0,950 Écart à la moyenne = 0,0027

Concernant l'établissement de la courbe B on doit préciser aussi que la présence d'azote dans le défécat ne peut constituer une source d'erreur appréciable. En effet, le pourcentage retrouvé est très faible [0,0019 à 0,0021 soit 10 fois moins que celui cité par LING (1951) dans le cas du lait].

4. — *Influence des sels de salage et de saumurage des viandes sur le pourcentage d'acide lactique retrouvé*

Dans le cas de produits transformés, les viandes sont soumises à un traitement technologique entraînant l'emploi de certains sels de salage ou de saumurage. Afin de savoir si les ions nitrate, nitrite et chlorure présents dans ces sels interfèrent dans le dosage de l'acide lactique, nous avons établi deux courbes B à partir de la même viande : l'une témoin, l'autre saumurée quatre jours à 4 °C dans une saumure à 15 p. 100 de NaCl (tabl. 5).

L'analyse de la variance a permis de mettre en évidence qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux traitements.

TABLEAU 5

*Influence des constituants de la saumure sur le dosage de l'acide lactique dans la viande salée*

| Surcharges d'acide lactique g/100 g de viande | Viande avant saumurage | | Viande après saumurage | |
|---|---|---|---|---|
| | Moyenne | Écart type | Moyenne | Écart type |
| 0,25 . . . . . | 0,059 (*) | 0,006 | 0,062 | 0,003 |
| 0,50 . . . . . | 0,114 | 0,001 | 0,111 | 0,003 |
| 0,75 . . . . . | 0,168 | 0,006 | 0,166 | 0,006 |
| 1,00 . . . . . | 0,224 | 0,006 | 0,229 | 0,010 |

(*) Chaque résultat figurant sur le tableau exprime une moyenne sur 5 échantillons.

II. — *Comparaison de la méthode selon* LING *à d'autres méthodes de dosage*

a) *A la méthode selon* BARKER-SUMMERSON

Les deux méthodes de dosage ont été comparées sur 19 échantillons de saucissons secs. Pour chaque échantillon étudié on a calculé les écarts entre les deux dosages. Dans douze cas, les concentrations en acide lactique données par la méthode selon LING sont supérieures à celles obtenues par la méthode selon BARKER-SUM-

MERSON. Dans quatre cas, les résultats sont semblables; enfin dans trois cas, les concentrations obtenues par la méthode de référencesont supérieures.

Les différences constatées entre les deux dosages sont cependant faibles (tabl. 6). Le coefficient de corrélation entre les deux séries de résultats est proche de 1 (0,969).

TABLEAU 6

*Comparaison des méthodes de* LING *et* BARKER-SUMMERSON *sur 19 échantillons*

| Moyenne des 19 dosages | | Différence entre les dosages (LING — BARKER-SUMMERSON) | |
|---|---|---|---|
| LING | BARKER-SUMMERSON | Moyenne | Valeurs extrêmes |
| 0,709 (*) | 0,681 | 0,026 | — 0,06, + 0,10 |

(*) Acide lactique exprimé en g pour 100 g d'échantillon.

L'utilisation du test *t* de STUDENT montre que dans 95 p. 100 des cas, les résultats obtenus par la méthode selon LING sont supérieurs à ceux obtenus par la méthode selon BARKER-SUMMERSON.

b) *Aux méthodes enzymatiques*

La médiocrité des résultats obtenus en utilisant la méthode selon KUBOWITZ et OTT comparativement à la méthode selon LING ne permet pas son application dans le cas des viandes. Celle selon STETTER et KANDLER, quelle qu'en soit sa précision, a priori, ne peut être utilisée à cause de son coût de mise en œuvre trop élevé.

## Discussion

La méthode que nous venons de décrire mérite d'être confrontée aux autres méthodes envisageables pour le dosage de l'acide lactique. La technique que nous avons utilisée pour l'extraction de l'ion lactate conduit à une solubilisation incomplète de ce dernier. On pourrait penser employer d'autres techniques permettant une extraction quantitative, par exemple celle de HILLIG (1937). Une telle méthode ne peut être utilisée pour des dosages de routine « le temps et la dextérité nécessaires pour l'utiliser en limitant son application générale » (GOULD, 1944).

Une autre méthode consiste à séparer quantitativement l'acide lactique sur des résines échangeuses d'ions type Dowex 2 (DIMOTAKI-KOURAKOU 1960) mais cette méthode ne s'applique que dans le cas d'échantillons liquides. Or, le broyat

TABLEAU 7

*Tableau synoptique du mode opératoire proposé pour le dosage de l'acide lactique dans les produits carnés*

• RÉACTIFS UTILISÉS : — chlorure de baryum 0,404 M
— soude 0,66 M
— sulfate de zinc 0,783 M
— solution de bleu de bromothymol 0,025 M NaOH 0,0015 M
— chlorure ferrique 0,062 M
— lactate de lithium 0,0104 M

MÉTHODE : 1. — *Extraction :*
— 10 g de viande dilués au 1/10e puis broyés,
— 10 mn au bain-marie bouillant,
— refroidir et filtrer = *Filtrat 1.*

2. — *Défécation :*
Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire :
— 10 ml de *Filtrat 1*
— 10 ml de chlorure de baryum 0,404 M
— 5 ml de soude 0,66 M
— 5 ml de sulfate de zinc 0,783 M.
Compléter à 100 — Agiter — Filtrer = *Filtrat 2*
Vérifier la neutralité à l'aide du bleu de bromothymol (0,025 M, NaOH 0,0015 M).

3. — *Dosage colorimétrique*
Ajouter à 10 ml de *Filtrat 2*
2 ml de chlorure ferrique 0,062 M.
Lecture des densités optiques à 425 nm contre un blanc déféqué.

4. — *Détermination de la concentration en acide lactique de l'échantillon*
en rapportant la densité optique sur la droite standard :

$$D = 0{,}217\ C - 0{,}002$$

Les concentrations lues en abcisses sont en gramme d'acide lactique pour 100 grammes de viande.

de viande est une suspension et non une solution ; on pourrait envisager une digestion préalable de la viande, ce qui alourdirait considérablement le dosage.

Pour être fiable, la méthode que nous proposons exige une extraction de l'acide lactique à chaud et l'établissement, non pas d'une courbe de référence avec des solutions dans l'eau à différentes concentrations en acide lactique mais l'obtention d'une courbe standard en ajoutant des surcharges d'acide lactique à des broyats de viande.

Pour des essais ordinaires nous proposons l'utilisation de l'équation permettant de déterminer, à partir d'une densité optique (D) la concentration (C) en g d'acide lactique pour 100 g de viande :

$$D = 0{,}217\ C - 0{,}002$$

Dans le cas de recherches plus élaborées sur des viandes très particulières, il sera nécessaire d'établir une courbe standard à partir de cette viande.

La comparaison avec la méthode selon BARKER-SUMMERSON habituellement

utilisée comme référence montre que les résultats obtenus se trouvent être semblables. La mise en œuvre de cette dernière méthode exige un lavage très méticuleux de tout le matériel utilisé, de très strictes conditions de manipulation, ainsi que l'utilisation d'acide sulfurique pur alors que la méthode décrite par LING dans le cas du lait ne demande que les précautions habituelles aux dosages chimiques. Il faut aussi noter que la méthode selon LING appliquée à la viande donne dans 95 p. 100 des cas des valeurs légèrement supérieures.

En conclusion, selon nous, après les modifications qu'impose la nature du substrat, la méthode colorimétrique décrite par LING pour le dosage de l'acide lactique dans le lait peut donc être étendue au cas des viandes et des produits carnés. Sa rapidité, sa simplicité et son prix de revient peu élevé en font une méthode particulièrement intéressante pour des dosages en série (tabl. 7).

*Reçu pour publication en octobre 1979.*

## Summary

*Ling's method application to the lactic acid titration in meat*

The application to meat and meat products of the method proposed by LING for determination of lactic acid has been explored. From our results it seems possible to adapt this method in the case of meat according the following procedure:

After lactic acid extraction 10 min. at 100 °C proteins are precipited with NaOH — $ZnSO_4$ in presence of $BaCl_2$. The filtrate is treated with $FeCl_3$ reagent and the resulting color is measured at 425 nm. Lactic acid is not entirely extracted and thence a standard curve is established to determine lactic acid concentrations in the samples from the optical density measurement.

In 95 p. 100 of the studied cases this proposed method fields better as compared to that of BARKER-SUMMERSON.

## Références bibliographiques

BARKER-SUMMERSON W. H., 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.*, **138,** 535-554.

DIMOTAKI-KOURAKOU V., 1960. Dosage de l'acide lactique à l'aide des échangeurs d'ions. *An. Fals. Exp. Chem.*, **53,** 569-580.

GOULD I. A., 1944. Lactic acid in dairy products. I. — Application of the Hillig méthod. *J. Dairy Sci.*, **27,** 743-752.

HILLIG F., 1937. The colorimetric determination of lactic acid in milk and milk products. *J. Ass. Off. Agri. Chem.*, **20,** 130-141.

JENSEN L. B., 1951. Microbiology of meats. 3rd Ed. Gerrad Press, Champaign, 111.

LING E. R., 1951. The determination of lactic acid in milk. *J. Sci. Food Agric.*, **2,** 279-289.

STETTER K., KANDLER P., 1973. Eine Schnellmethode zur quantitativen Bestimmung von L (+) und D (—) Milchsaure in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **152,** 257-262.

SZYLIT O., 1973. Les voies métaboliques de la dégradation de l'amidon dans le jabot de *Gallus gallus* et leurs incidences nutritionnelles. Thèse Doctorat d'État (Faculté des Sciences, Paris).

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (3), 345-355.

# Effet des moisissures du genre penicillium sur l'activité laccase du botrytis cinerea

V. KOVAC

*Faculté de Technologie de Novi Sad*
*21000 Novi Sad, Yougoslavie*

## Résumé

*Botrytis cinerea* possède dans son équipement enzymatique une polyphenoloxydase de type laccase. Dans ce travail nous avons montré que ce champignon pouvait avoir des activités de niveaux très variables suivant la souche mise en œuvre, suivant aussi qu'il est cultivé en association ou non avec des moisissures du genre *Penicillium*. Ces dernières, pourtant dépourvues d'activité laccase, peuvent entraîner une exaltation de l'activité du *B. Cinerea*.

Mots-clés : *B. Cinerea, Penicillium, activité laccase.*

## Introduction

Il y a longtemps que l'on connait les conséquences œnologiques du développement de *Botrytis Cinerea* sur le raisin dont la principale est la destruction de la matière colorante des jus ou des vins exposés à l'air. C'est la casse oxydasique ou casse brune dont l'agent responsable est un polyphenoloxydase du type laccase secrétée par *Botrytis cinerea* (DUBERNET, RIBEREAU-GAYON 1973; DUBERNET 1974; KOVAC *et al.*, 1975).

Mais ces effets sont souvent très variables (CASSIGNARD 1963; CORDONNIER *et al.* 1979). De nombreuses causes peuvent expliquer ces variations. Parmi elles, nous avons retenu dans ce travail, celles pouvant faire intervenir soit le champignon lui-même soit la flore fongique qui l'accompagne le plus fréquemment sur le raisin à savoir les moisissures du genre *Penicillium* qui, après *Botrytis cinerea* sont aussi les plus abondantes.

En définitive nous avons cherché à savoir s'il existe des différences entre les souches de *Botrysis cinerea* du point de vue de leur activité laccase et à apprécier

les effets de cultures associées de *Penicillium* bien que ce champignon tout au moins l'espèce *P. expansum Link* soient réputés sans activité laccase (MILISAVLJEVIC 1957; SCHANDERL 1959).

## Matériel et méthode de travail

Au cours de ces recherches nous avons utilisé 27 souches de *B. cinerea* et 15 espèces de *Penicillium*.

Les souches de *B. cinerea* qui, dans notre collection, sont enregistrées comme Bc-1, Bc-3, Bc-4, Bc-7, Bc-10, Bc-12, Bc-14, Bc-15, Bc-17, Bc-19, Bc-20, Bc-22, Bc-23, Bc-26, Bc-28, Bc-30, Bc-31, Bc-32, Bc-34, Bc-35, Bc-36, Bc-37 et Bc-38 ont été isolées du raisin de la région viticole de Voïvodina (Yougoslavie), les souches C.B.S. 121.30 et C.B.S. 810.69 proviennent de la mycothèque du Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn, Hollande et les souches M-129 et M-196 de la mycothèque du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris.

Des 15 espèces de *Penicillium*, l'une *P. variabile Soop* a été isolée et déterminée en Yougoslavie (MUNTANJOLA, 1974), les autres proviennent de la mycothèque de Baarn.

Les souches de *B. cinerea* et les espèces de *Penicillium* ont été conservées par repiquages fréquents sur moût de raisin gélosé. Pour toutes les expériences, on a utilisé le milieu synthétique favorable au développement de *B. cinerea* et à la synthèse de la laccase (KOVAC *et al.*, 1975).

Les cultures ont été faites, à la température du laboratoire (20° — 22°) dans des fioles coniques de 250 ml contenant 100 ml de milieu liquide stérilisé à l'autoclave.

Comme certaines des moisissures sporulent peu ou ne sporulent pas, l'ensemencement a été fait par prélèvement d'une partie de mycélium avec ou sans spores, cultivé cinq à dix jours sur moût de raisin gélosé.

L'activité laccase dans le filtrat du milieu de culture a été recherchée au moyen de la réaction colorée, extrêmement sensible de la syringaldazine (HARKIN et OBST, 1973) et mesurée en utilisant le diméthoxy-2,6 phénol (BROWN et BOCKS, 1963) en solution dans le tampon Mc ILVAINE pH 5,5, à la concentration de $3{,}33 \cdot 10^{-5}$M. L'activité est alors donnée en unités arbitraires par la vitesse initiale de formation de la diphénoquinone ($\Delta$ DO 470/mn) (KOVAC *et al.*, 1975).

## Résultats et discussion

### *Propriétés des différentes souches de Botrysis cinerea*

Au cours de l'isolement des souches de *P. cinera* en Yougoslavie, nous avons remarqué qu'elles se différenciaient entre elles par leur activité laccase. Comme on pouvait supposer que ces différences résultaient de la nature variée des milieux dont elles provenaient, nous avons continué à suivre leur aptitude à la synthèse de la laccase, après leur culture au laboratoire.

Le tableau I présente la comparaison des activités de laccase en 1974 et en 1976 après plusieurs mois de repiquages successifs. Les données représentent les valeurs de l'activité des milieux de culture, mesurée au bout de 30 jours de culture. On a représenté sur le même tableau l'appréciation visuelle de l'intensité de la sporulation (— sans sporulation; + sporulation faible; ++ sporulation moyenne et +++ sporulation forte).

TABLEAU I

*Activité laccase de différentes souches de* Botrytis cinerea

| | Résultats de 1974 | | Résultats de 1976 | |
|---|---|---|---|---|
| | DO/mn/ml | Intensité de sporulation | DO/mn/ml | Intensité de sporulation |
| Bc-1 | 0,35 | ++ | 0,34 | + |
| Bc-3 | 0,60 | ++ | 0,43 | + |
| Bc-4 | 1,35 | +++ | 0,67 | +++ |
| Bc-7 | 1,70 | + | 0,88 | + |
| Bc-10 | 1,90 | — | 1,08 | — |
| Bc-12 | 1,75 | +++ | 1,50 | +++ |
| Bc-14 | 2,50 | ++ | 1,38 | + |
| Bc-15 | 1,20 | +++ | 0,81 | ++ |
| Bc-17 | 0,00 | ++ | 0,07 | ++ |
| Bc-19 | 0,35 | + | | |
| Bc-20 | 1,00 | ++ | 0,91 | ++ |
| Bc-22 | 1,45 | +++ | | |
| Bc-23 | 0,30 | +++ | 0,11 | — |
| Bc-26 | 1,30 | + | | |
| Bc-28 | 0,47 | ++ | 0,60 | ++ |
| Bc-30 | 2,10 | + | 0,39 | + |
| Bc-31 | 1,20 | +++ | 0,50 | — |
| Bc-32 | 0,23 | +++ | 0,55 | +++ |
| Bc-34 | 0,10 | ++ | 0,13 | — |
| Bc-35 | 0,15 | ++ | 0,27 | + |
| Bc-36 | 1,35 | ++ | 0,98 | + |
| Bc-37 | 0,15 | ++ | 0,16 | + |
| Bc-38 | 1,45 | +++ | 0,97 | +++ |

| | Résultats de 1974 | | Résultats de 1976 | |
|---|---|---|---|---|
| | DO/mn/ml | Intensité de sporulation | DO/mn/ml | Intensité de sporulation |
| C.B.S. 121.39 | traces | — | traces | — |
| C.B.S. 810.69 | traces | — | 0,00 | — |
| M-129 | 0,41 | — | 0,42 | — |
| M-196 | 0,41 | — | 0,03 | — |

Les résultats montrent que les différences entre les moisissures étudiées subsistent même après une culture prolongée dans les mêmes conditions. L'activité laccase plus ou moins grande est donc liée à la nature de la souche, et cette propriété est en général stable. A côté des souches qui synthétisent la laccase, il en existe d'autres qui n'en synthétisent que des traces (ex. : C.B.S. 121.39, C.B.S. 810.69, Bc-17 et Bc-34).

En comparant les valeurs obtenues en 1974 et en 1976, on voit que, dans le cas de plusieurs souches, l'aptitude à la synthèse de la laccase s'est affaiblie après deux ans de culture, tandis que chez les autres elle est restée inchangée ou même s'est élevée, comme c'est le cas des souches Bc-28, Bc-32 et Bc-35.

Il existe des souches qui ne sporulent pas et n'ont pas d'activité laccase (ex.: C.B.S. 121.39 et C.B.S. 810.69), mais aussi des souches qui ne sporulent pas et se distinguent par leur forte activité de laccase (ex. : M-129, Bc-10 et Bc-36). D'autre part, si l'on examine les souches qui sporulent fortement, on s'aperçoit que certaines d'entre elles ont une faible activité laccase (ex. : Bc-28 et Bc-32) d'autres au contraire une forte (ex. : Bc-12 et Bc-38). L'activité laccase n'est donc pas liée à la sporulation.

### *Influence de certaines espèces de Penicillium sur la synthèse de la laccase de Botrytis cinerea*

A l'occasion d'une contamination accidentelle d'une culture de la souche Bc-4 de *Botrytis cinerea* par un *Penicillium*, nous avons constaté une augmentation très forte de l'activité enzymatique dans le milieu de culture. Nous avons d'abord supposé que ce *Penicillium* (dont la détermination ultérieure a montré qu'il s'agissait de *Penicillium variabile Soop*) produisait lui-même de la lacasse. Mais, en culture pure, il n'a secrété aucune activité enzymatique; il était donc clair que l'augmentation de l'activité oxydasique de la culture contaminée était le résultat d'une action exercée par le *Penicillium* sur le *B. cinerea*.

La question qui se posait était de savoir si cette stimulation est propriété commune du genre *Penicillium* ou seulement de certaines espèces. L'expérience a donc été élargie à l'étude de l'action réciproque de *B. cinerea* et de 15 espèces de *Penicillium*. Parmi les souches de *B. cinerea* nous avons utilisé Bc-4. Pour obtenir des associations d'espèces en proportions différentes, l'ensemencement de *B. cinerea* et des *Penicillium* étudiés a été fait soit en même temps, soit avec une avance de quelques jours pour l'une d'entre elles. La surface occupée par *B. cinerea* dans chaque fiole a été estimée visuellement et exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale du milieu (tabl. 2, col. 3). L'activité enzymatique (tabl. 2, col. 4) est celle des milieux, mesurée 15 jours après le début de l'expérience. Pour mieux évaluer l'influence de *Penicillium* sur le *B. cinerea*, l'activité enzymatique a été exprimée par rapport au témoin pris comme unité (tabl. 2, col. 5) et par rapport à l'activité trouvée lorsque *B. cinerea* occupe 100 p. 100 de la surface du milieu (tabl. 2, col. 6).

Le tableau 2 regroupe les résultats des recherches sur l'action de 9 espèces de *Penicillium* sur le *B. cinerea*. Pour les 6 autres (*P. expansum Link*, 345.54; *P. brevi compactum* Dierckx, 629.66; *P. notatum* Westling, 906.70; P. *notatum* Westling, 339.48; *P. multicolor*, 351.48; *P. nigricans*, 744.70 et *P. italicum* Cenner, 339.48) actuellement nous ne sommes pas sur du sens de leur action sur le *B. cinerea*.

De ces résultats nous pouvons d'abord conclure que la stimulation de la synthèse de la laccase de *B. cinerea* par le *Penicillium* n'est pas une propriété du genre,

TABLEAU 2

*Influence de différentes espèces de* Penicillium *sur la synthèse de la laccase par le* B. cinerea.

| N° Moisissure | Surface recouverte par *B. cinerea* (en p. 100) | Activité enzymatique | | |
|---|---|---|---|---|
| | | DO/mn/ml | Exprimée par rapport au témoin | Réévaluée à 100 p. 100 en surface |
| 1 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1. *B. cinerea* (témoin) . . . . . | 100 | 0,495 | 1 | 1 |
| 2. *P. funiculatum* . . . . . | 10 | 0,165 | 0,33 | 3,33 |
| 3. 629.66 . . . . . | 20 | 0,825 | 1.67 | 8,35 |
| 4. . . . . | 30 | 0,960 | 1,94 | 6,47 |
| 5. *P. cyclopium* . . . . . | 10 | 0,120 | 0,24 | 2,40 |
| 6. Westling 630.66 . . . . . | 80 | 0,760 | 1,54 | 1,93 |
| 7. . . . . | 90 | 0,625 | 1,26 | 1,40 |
| 8. *P. frequentans* . . . . . | 10 | 0,300 | 0,61 | 6,10 |
| 9. 787.70 . . . . . | 20 | 0,435 | 0,88 | 4,40 |
| 10. . . . . | 80 | 0,845 | 1,71 | 2,14 |
| 11. *P. roqueforti* . . . . . | 25 | 0,445 | 0,90 | 3,60 |
| 12. . . . . | 50 | 1,110 | 2,24 | 4,48 |
| 13. . . . . | 90 | 1,350 | 2,73 | 3,03 |
| 14. *P. oxalicum* . . . . . | 10 | 0,450 | 0,91 | 9,10 |
| 15. Currie et Thom. . . . . | 20 | 0,700 | 1,41 | 7,05 |
| 16. 219.30 . . . . . | 90 | 1,110 | 2,24 | 2,49 |
| 17. *P. purpurogenum Stool*. . . . . | 20 | 0,660 | 1,33 | 6,65 |
| 18. var. *rubri*, sclerotium. . . . . | 30 | 0,750 | 1,52 | 5,07 |
| 19. Thom 270.35. . . . . | 40 | 0,625 | 1,26 | 3,15 |
| 20. *P. camemberti* . . . . . | 50 | 1,200 | 2,42 | 4,85 |
| 21. Thom . . . . . | 70 | 0,600 | 1,21 | 1,73 |
| 22. 299.48 . . . . . | 80 | 0,450 | 0,91 | 1,14 |
| 23. *P. chrysogenum* . . . . . | 5 | 0,235 | 0,47 | 9,40 |
| 24. Thom . . . . . | 10 | 0,385 | 0,78 | 7,77 |
| 25. 306.48 . . . . . | 20 | 0,760 | 1,54 | 7,70 |
| 26. *P. variabile* . . . . . | 10 | 1,925 | 3,89 | 38,88 |
| 27. *Soop* . . . . . | 20 | 2,900 | 5,86 | 29,30 |
| 28. . . . . | 30 | 2,630 | 5,31 | 17,70 |

mais de certaines espèces de *Penicillium*. Nous avons l'impression que certaines espèces ne stimulent pas ou même abaissent la synthèse de la laccase par le *B. cinerea*. Mais celles dont la propriété stimulante est absolument claire sont plus nombreuses. Les exemples types en sont : *P. variabile, P. chrysogenum* et *P. oxalicum*.

Il est difficile de connaître le rapport optimal entre *B. cinerea* et *Penicillium* pour que la stimulation soit maximale; il semble que cela dépende de l'espèce du *Penicillium*.

### *Induction de la synthèse de la laccase de Botrytis cinerea par Penicillium variabile Soop.*

D'après les résultats du tableau 1, il existe des souches de *B. cinerea* qui ne produisent pas de laccase dans les conditions expérimentales décrites. Nous avons voulu rechercher si elles n'en produisaient pas en association avec *P. variabile*. L'influence de *P. variabile* sur certaines souches de *B. cinerea* s'étant manifestée plus ou moins rapidement suivant les cas, nous avons suivi l'activité enzymatique tous les 5 jours pendant 30 jours et indiqué dans le tableau 3 les résultats obtenus au moment où la stimulation était la plus évidente.

TABLEAU 3

*Influence de* P. variabile Soop *sur la synthèse de la laccase par différentes souches de* B. cinerea

| Souche de *B. cinerea* | Surface recouverte par *B. cinerea* (en p. 100) | Age des cultures (jours) | Activité enzymatique | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | DO/mn/ml | Exprimée par rapport au témoin | Réévaluée à 100 p. 100 surface |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Bc-1 | témoin (100) | 20 | 0,338 | 1 | 1 |
| — | 60 | 20 | 0,585 | 1,73 | 2,88 |
| — | 80 | 20 | 0,565 | 1,67 | 2,09 |
| — | 90 | 20 | 0,720 | 2,13 | 2,37 |
| Bc-3 | témoin (100) | 30 | 0,430 | 1 | 1 |
| — | 50 | 30 | 0,700 | 1,63 | 3,26 |
| — | 80 | 30 | 0,940 | 2,19 | 2,74 |
| — | 90 | 30 | 1,270 | 2,95 | 3,28 |
| Bc-4 | témoin (100) | 30 | 0,665 | 1 | 1 |
| — | 30 | 30 | 2,150 | 3,23 | 10,77 |
| — | 40 | 30 | 1,805 | 2,71 | 6,78 |
| — | 80 | 30 | 1,300 | 1,95 | 2,44 |
| Bc-7 | témoin (100) | 30 | 0,875 | 1 | 1 |
| — | 5 | 30 | 0,640 | 0,73 | 14,60 |
| — | 10 | 30 | 1,125 | 1,29 | 12,90 |
| — | 20 | 30 | 2,150 | 2,46 | 12,30 |

TABLEAU 3 *(Suite)*

| Souche de *B. cinerea* | Surface recouverte par *B. cinerea* (en p. 100) | Age des cultures (jours) | Activité enzymatique | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | DO/mn/ml | Exprimée par rapport au témoin | Réévaluée à 100 p. 100 surface |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Bc-10 | témoin (100) | 30 | 1,080 | 1 | 1 |
| — | 30 | 30 | 0,300 | 0,28 | 0,93 |
| — | 60 | 30 | 0,665 | 0,62 | 1,03 |
| — | 80 | 30 | 0,900 | 0,83 | 1,04 |
| Bc-12 | témoin (100) | 30 | 1,495 | 1 | 1 |
| — | 20 | 30 | 1,730 | 1,16 | 5,80 |
| — | 40 | 30 | 1,700 | 1,14 | 2,85 |
| — | 50 | 30 | 2,030 | 1,36 | 2,72 |
| Bc-14 | témoin (100) | 15 | 0,945 | 1 | 1 |
| — | 40 | 15 | 0,590 | 0,62 | 1,55 |
| — | 50 | 15 | 1,080 | 1,14 | 2,28 |
| — | 60 | 15 | 3,150 | 3,33 | 5,56 |
| Bc-15 | témoin (100) | 30 | 0,805 | 1 | 1 |
| — | 30 | 30 | 0,590 | 0,73 | 0,43 |
| — | 40 | 30 | 0,900 | 1,12 | 2,80 |
| — | 60 | 30 | 1,175 | 1,46 | 2,43 |
| Bc-17 | témoin (100) | 30 | 0,070 | 1 | 1 |
| — | 50 | 30 | 0,200 | 2,86 | 5,72 |
| — | 60 | 30 | 0,255 | 3,64 | 6,07 |
| — | 70 | 30 | 0,300 | 4,29 | 6,13 |
| Bc-20 | témoin (100) | 15 | 0,955 | 1 | 1 |
| — | 20 | 15 | 2,650 | 2,77 | 13,85 |
| — | 30 | 15 | 1,875 | 1,96 | 6,53 |
| — | 50 | 15 | 1,540 | 1,61 | 3,22 |
| Bc-23 | témoin (100) | 30 | 0,105 | 1 | 1 |
| — | 40 | 30 | 0,085 | 0,81 | 2,03 |
| — | 60 | 30 | 0,120 | 1,14 | 1,90 |
| — | 70 | 30 | 0,130 | 1,24 | 1,77 |
| Bc-28 | témoin (100) | 20 | 0,442 | 1 | 1 |
| — | 30 | 20 | 0,405 | 0,92 | 3,07 |
| — | 40 | 20 | 1,040 | 2,35 | 5,88 |
| — | 80 | 20 | 0,615 | 1,39 | 1,74 |
| Bc-30 | témoin (100) | 20 | 0,497 | 1 | 1 |
| — | 30 | 20 | 0,305 | 0,61 | 2,03 |
| — | 50 | 20 | 0,870 | 1,75 | 3,50 |
| — | 90 | 20 | 0,810 | 1,63 | 1,81 |
| Bc-31 | témoin (100) | 30 | 0,502 | 1 | 1 |
| — | 10 | 30 | 0,00 | | |
| — | 40 | 30 | traces | | |

TABLEAU 3 *(Suite)*

| Souche de *B. cinerea* | Surface recouverte par *B. cinerea* (en pour cent) | Age des cultures (jours) | Activité enzymatique | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | DO/mn/ml | Exprimée par rapport au témoin | Réévaluée à 100 pour cent surface |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Bc-32 | témoin (100) | 30 | 0,553 | 1 | 1 |
| — | 60 | 30 | 1,215 | 2,20 | 3,67 |
| — | 80 | 30 | 1,030 | 1,86 | 2,33 |
| — | 90 | 30 | 0,770 | 1,39 | 1,54 |
| Bc-34 | témoin (100) | 30 | 0,130 | 1 | 1 |
| — | 10 | 30 | traces | | |
| — | 30 | 30 | 0,050 | 0,38 | 1,26 |
| — | 40 | 30 | 0,070 | 0,54 | 1,35 |
| Bc-35 | témoin (100) | 30 | 0,265 | 1 | 1 |
| — | 40 | 30 | 0,265 | 1 | 2,50 |
| — | 50 | 30 | 0,370 | 1,40 | 2,80 |
| — | 80 | 30 | 0,435 | 1,64 | 2,05 |
| Bc-36 | témoin (100) | 20 | 0,972 | 1 | 1 |
| — | 30 | 20 | 0,265 | 0,27 | 0,90 |
| — | 80 | 20 | 0,850 | 0,87 | 1,09 |
| — | 90 | 20 | 0,940 | 0,97 | 1,08 |
| Bc-37 | témoin (100) | 20 | 0,225 | 1 | 1 |
| — | 40 | 20 | 0,165 | 0,73 | 1,83 |
| — | 60 | 20 | 0,485 | 2,16 | 3,60 |
| — | 70 | 20 | 0,445 | 1,98 | 2,83 |
| Bc-38 | témoin (100) | 20 | 0,887 | 1 | 1 |
| — | 60 | 20 | 1,725 | 1,94 | 3,23 |
| — | 80 | 20 | 1,700 | 1,92 | 2,40 |
| — | 90 | 20 | 1,600 | 1,80 | 2,00 |
| C.B.S. 121.39 | témoin (100) | 30 | traces | | |
| — | 10 | 30 | 0,205 | | |
| — | 20 | 30 | 0,260 | | |
| C.B.S. 810.69 | témoin (100) | 30 | 0,000 | | |
| — | 60 | 30 | traces | | |
| — | 80 | 30 | traces | | |
| M-129 | témoin (100) | 30 | 0,415 | 1 | 1 |
| — | 40 | 30 | traces | | |
| — | 70 | 30 | traces | | |
| M-196 | témoin (100) | 30 | 0,032 | 1 | 1 |
| — | 50 | 30 | 0,060 | 1,88 | 2,76 |
| — | 90 | 30 | 0,120 | 3,75 | 4,16 |
| — | 100 | 30 | 0,185 | 5,78 | 5,78 |

Le tableau 3 montre que parmi les 24 souches de *B. cinerea* étudiées, certaines sont insensibles à la présence de *P. variabile* (Bc-10, Bc-34 et Bc-36) ou même forment alors moins de laccase (M-129 et Bc-31). Mais le nombre de celles qui produisent la laccase en plus grande quantité en présence de *Penicillium* est plus grand. Les exemples les plus caractéristiques sont les souches Bc-4, Bc-7 et Bc-20; dans certains cas la synthèse de laccase par unité de masse de mycélium de *B. cinerea* est multipliée par plus de 10, ou même par près de 40, comme le montrent les résultats relatifs au *P. variabile Soop* sur Bc-4 (tabl. 2).

Les activités enzymatiques figurant dans la colonne 4 du tableau 3 donnent les valeurs réelles de la capacité de leur synthèse de la laccase. Ainsi, la quantité de laccase formée par la souche M-196 peut être multipliée par 6, mais elle reste négligeable même par rapport aux témoins des autres souches bonnes productrices de laccase. Semblables à la souche M-196 sont les souches Bc-17, Bc-23 et Bc-37, et surtout la souche C.B.S. 810.69 qui, même sous l'action de *Penicillium variabile Soop* n'a produit que des traces de laccase.

Il est difficile de savoir les raisons de l'exaltation de l'activité laccasse que nous avons constatée dans les cultures de *Botrytis cinerea*.

Nous avons vérifié que les concentrés de milieu de culture de *Penicillium variabile* ajoutés à un extrait de laccase, n'avaient pas d'effet activateur de l'enzyme. Les concentrés de milieu de culture de Penicillium variabile *Soop* ont été préparés par adsorption sur charbon actif, désorption à l'éther et évaporation sous vide. Le résidu sec est repris par de l'eau distillée.

Par contre, ajoutés au milieu de culture dans lequel croît *B. cinerea*, il semble bien avoir une action inductrice puisqu'il n'a pas d'effet sur la biomasse formée mais augmente fortement les activités spécifiques des milieux de culture (tabl. 4).

TABLEAU 4

*Influence de l'addition de concentré de milieu de culture de* P. variabile Soop *sur l'activité laccase de* B. cinerea

| Quantité de concentré ajouté (ml pour 100 ml) | Poids sec du mycélium (en g) | Activité enzymatique | | |
|---|---|---|---|---|
| | | DO/mn/ml | Activité totale | Activité spécifique |
| 0 (témoin) . . . . . | 1,423 | 0,318 | 19,41 | 13,64 |
| 0,4 . . . . . | 1,455 | 0,378 | 23,96 | 16,47 |
| 0,8 . . . . . | 1,450 | 0,605 | 37,36 | 25,76 |
| 1,2 . . . . . | 1,399 | 0,638 | 40,52 | 28,96 |
| 1,6 . . . . . | 1,432 | 0,770 | 49,50 | 34,57 |

C'est la raison pour laquelle, en première approximation, nous avons employé dans ce travail les termes de « synthèse » ou « production » de laccase.

## Conclusion

En ce qui concerne l'activité laccase, de grandes différences apparaissent entre les différentes souches de *B. cinerea*. Ces différences semblent être une propriété inhérente à la souche. La valeur technologique du raisin ne devrait donc pas être considérée uniquement d'après l'intensité de l'envahissement du raisin, mais aussi d'après le type de moisissure qui le parasite.

Parmi les 15 espèces de *Penicillium* étudiées aucune n'a montré d'activité laccase; il semble donc que la conclusion puisse être étendue au genre *Penicillium*.

Bien que le *Penicillium* seul ne synthétise pas la laccase, l'effet inducteur qu'il exerce sur la synthèse de la laccase par *B. cinerea*, le range parmi les facteurs importants de l'apparition de la casse oxydasique. Dans les conditions naturelles, en effet, les moisissures ne se développent pas séparément comme des cultures pures, mais le développement de l'une est suivi par le développement de l'autre.

Dans le cadre de ce travail, afin d'égaliser les conditions de milieu, toutes les expériences ont été faites en utilisant un milieu synthétique. Le comportement de nos souches sur le raisin dans les conditions naturelles, et l'étude de l'action de *Penicillium* sur *B. cinerea* dans ces conditions, seront les sujets de notre prochain travail.

*Reçu pour publication en octobre 1979.*

## Summary

*Influence of* Penicillium *on the production of laccase by* Botrytis cinerea

*B. cinerea* releases in the culture medium polyphenoloxidase with laccase activity. The level of activity depends on the strain and on the presence of *Penicillium* in the case of associated culture. However pure cultures of *Penicillium* lacks of laccase. It has been shown that *Penicillium* increases the natural laccase activity of *B. cinerea*.

Key words : *Botrytis cinerea, Penicillium, laccase.*

## Références bibliographiques

Brown B. R., Bocks S. M., 1963. Somme new enzymic reactions in Enzyme Chemistry of phenolic compounds, 129-138. PergamonPress, Oxford, London, New York, Paris.

Cassignard R., 1963. Étude expérimentale de la vinification en blanc. Thèses présentées à la Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux.

Cordonnier R., Hurtrel J., Biron C., 1979. Relation entre le taux de pourriture de la vendange, l'activité laccase et l'aptitude à la casse des moûts et des vins. *Journées Internationales du groupe Polyphénol de Logrono.*

DUBERNET M., RIBEREAU-GAYON P., 1973. Les « polyphénoloxydases » du raisin sain et du raisin parasité par *Botrytis cinerea*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, série D, 277, 1313-1316.

DUBERNET M., 1974. Recherche sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea*. Applications technologiques. Thèse Doct. 3e cycle, Bordeaux.

HARKIN J. M., OBST J. R., 1973. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxydase in fungi. *Experientia*, **29**, 381-387.

KOVAC V., LEGRAND G., NEUMANN J., LAVOLLAY J., 1975. Sur la laccase de *Botrytis cinerea* cultivé sur milieu artificiel substrats spécifiques. Assemblée annuelle du Groupe Polyphéols, Gargnano sul Garda, 21-23 mai 1975.

MILISAVLJEVIC D., 1957. Influence de la moisissure verte (*Penicillium expansum Link*) sur le raisin et sur la qualité du vin (en serbocroate). *Poljoprivreda Vojvodine*, N-6.

MUNTANJOLA M., 1974. Communication personnelle. Institut des recherches biologiques. Belgrad.

RIBEREAU-GAYON J., 1970. Études récentes sur les facteurs et les effets de la pourriture du raisin.

SCHANDERL R. L., 1959. II. — Die microbiologie des mostes und weines. *Verlag Eugen Ulmer*, Stuttgart, 196-200.

# RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7 avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

*Au début de chaque mémoire,* on indiquera : — *le titre du mémoire:* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de...; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

*Les mémoires* seront rédigés, autant que possible d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé:* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences; d) *résultats,* à présenter de la manière la plus brève possible; e) *discussion et conclusion;* f) *titre et résumé* anglais ou destinés à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

*Les travaux originaux en anglais* doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

*Pour les autres documents* (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

*Les références bibliographiques* doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954) Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

*Pour les articles:* le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s); la date de parution de l'article; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C.N.R.S.;* le volume; la première et la dernière page de l'article.

*Pour les ouvrages:* le nom de l'auteur avec les initiales du prénom; la date de l'édition; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine); le volume; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs; le nom de l'éditeur; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts, » le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

*Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part.* Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

*Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils* seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I.N.R.A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19 cm; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

*Photographies:* Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normss suivantes : 2 photos : 9 × 12; 4 photos : 9 × 5,5; 6 photos : 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

*Envoi du manuscrit:* M. Bourdet, Laboratoire de Technologie des Blés, 16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris, ou M. Dupuy, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, Centre de Recherches de Dijon, 21034 Dijon Cedex. On demande deux exemplaires.

*Correction des épreuves:* les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à M. Bourdet.

Technologie agricole.

CPPAP n° 1433 ADEP *Le Directeur de la publication :* M.-L. Cagnac

F.D. Imprimerie Alençonnaise, rue Edouard-Belin, 61002 Alençon

AMÉLIORATION des PLANTES
2 3 MAI 1980
VERSAILLES

# annales de technologie agricole

Trimestriel

1979

Vol. 28 - N° 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

*Ann. Technol., agric.*, 1979, **28** (4), 357-369

# Constituants membranaires de pailles traitées ou non à la soude

A. M. RIQUET, M. T. TOLLIER

*Laboratoire de Technologie Alimentaire I.N.R.A.*
*1, avenue des Olympiades, 91305 Massy*

## Résumé

Dans le but d'étudier les polyosides membranaires de pailles de blé traitées ou non à la soude, les fractions hémicelluloses et cellulose ont été estimées d'une part à l'aide de méthodes conventionnelles faisant appel à des détergents en milieu neutre ou acide et, d'autre part, avec une méthode de fractionnement par hydrolyses acides progressives, permettant de doser séparément les principaux constituants de ces différentes fractions.

L'analyse systématique des fractions résiduelles à l'action des réactifs au détergent neutre (résidu membranaire ou NDF) et acide (résidu lignocellulose ou ADF) permet, en partie, d'expliquer la variabilité des résultats fournis soit par les méthodes conventionnelles soit par l'analyse plus fine. Dans les pailles témoins ou traitées, 10 à 20 p. 100 d'hémicelluloses sont solubilisées dans le réactif au détergent neutre; par contre, 10 à 15 p. 100 demeurent dans les résidus lignocellulosiques (ADF).

Quel que soit le type de méthode utilisée, on constate une diminution nette (environ 20 p. 100) du pourcentage des hémicelluloses dans les pailles traitées à la soude. La méthode de fractionnement montre que cette diminution résulte essentiellement de la solubilisation des pentoses. La fraction cellulose ne semble pas affectée par ce traitement alcalin.

Mots clés : *cellulose-polyosides de structure non cellulosiques — hémicelluloses — lignine.*

## Introduction

Les membranes cellulaires représentent 80 à 90 p. 100 de la matière sèche des fourrages pauvres tels que les pailles, les balles de céréales, les drèches, les cannes de maïs. Les polyosides de structure qui les constituent, cellulose et hémicelluloses ne sont que peu ou pas dégradés par la microflore digestive du ruminant, en raison de leur association mutuelle. Pour pallier cet inconvénient, de nombreux traitements mécaniques, chimiques ou enzymatiques ont été proposés en vue d'accroître la digestibilité de tels polyosides (Rexen et Moller, 1974, Jouany,

1975). Parmi les différentes possibilités, les traitements chimiques par les alcalis semblent les plus efficaces, ils améliorent de façon sensible la valeur nutritive des pailles de blé sans nécessiter, au niveau technologique, un appareillage compliqué et coûteux (Ololade et Mowat, 1970, Bramaw et Abe, 1977; Capper et Morgan, 1977). Le but de cette recherche a donc été de doser les polyosides membranaires de pailles de blé soumises ou non à l'action de la soude, en vue de mieux connaître les modifications biochimiques subies par les membranes des tissus lignifiés après un tel traitement. Dans cette optique, trois types d'analyses ont été retenus :

— estimation globale par utilisation de détergents des teneurs en cellulose (C) et en hémicelluloses (HC). Cette dernière fraction comprenant l'ensemble des polyosides non cellulosiques et les substances pectiques présentes dans les parois cellulaires;

— fractionnement par hydrolyses acides successives (Salo, 1965), qui permet de caractériser et de doser les monomères provenant de la dégradation des hémicelluloses et de la cellulose;

— dosage des pentoses et de leurs homologues supérieurs, par hydrolyse et déshydratation en furfural (Duffau, 1946; Cerning et Guilbot, 1973).

## Matériel et méthodes

L'étude effectuée porte sur deux pailles de blé (une paille de blé I.N.R.A. et une paille de blé I.T.C.F.) traitées à la soude soit par voie sèche (TVS), soit par voie humide (TVH).

### *Voie sèche*

Un kilogramme de paille broyée a été mélangé mécaniquement à une solution de soude ( 300 g d'eau + 50 g de soude) puis introduit dans une presse à filière. Dans ce cas l'action de la soude est très rapide (20 s à 1 min) et a lieu en majeure partie dans la presse grâce à la température et à la pression très élevée qui y règnent.

### *Voie humide*

Un kilogramme de paille hachée a été mélangé à la fourche à une solution constituée de 2 500 g d'eau et 50 g de soude. Le trempage de la paille se fait à température ambiante pendant 24 à 48 h, puis elle est lavée et séchée à l'air libre.

Les échantillons analysés ont été séchés à l'étuve à 80 °C puis passés au tamis de 0,8 mm.

### *Méthodes d'analyses*

Les teneurs en eau (dessiccation 1 h 30 min à 130 °C), en matières minérales (calcination une nuit à 550 °C), en matières protéiques (méthode Kjeldahl) ont été déterminées selon les méthodes de référence mentionnées dans « Méthodes

analytiques des céréales » du C.N.E.R.N.A., 1958. Les proportions de cellulose et d'hémicelluloses ont été dosées à partir des échantillons initiaux soit par action successive d'acide et de soude (Henneberg et Stokmann,1869), soit par utilisation de détergents en milieu neutre (Van-Sœst et Wine, 1967) ou acide (Van-Sœst, 1963) ou encore par action de l'acide formique (Guillemet et Preceptis, 1942; Tollier, résultats non publiés). Par ailleurs, les glucides membranaires ont été analysés par une méthode de fractionnement consistant en deux hydrolyses acides progressives (Salo, 1965) : tous les échantillons subissent au préalable une extraction par l'éthanol à 80°, à reflux, de façon à éliminer les substances de faibles poids moléculaires dont l'importance est évaluée en mesurant, sur une partie aliquote de l'extrait la quantité de matière sèche. Les résidus de cette extraction éthanolique sont traités par l'acide chlorhydrique 0,7 N pendant 5 h à 96 °C, traitement qui a pour effet de solubiliser la majeure partie des hémicelluloses. La fraction résiduelle est soumise à l'action de l'acide sulfurique environ 27 N, à 20 °C pendant 4 h, puis elle est maintenue à ébullition pendant 4 h dans ce même acide dilué 35 fois par de l'eau distillée. La perte de poids correspond à la lignine brute.

A partir des extraits chlorhydriques et sulfuriques obtenus, neutralisés ou non à l'aide d'une résine anionique (Duolite A 102 D de Diaprosine) ont été réalisées les déterminations des substances réductrices (Nelson, 1944), des teneurs en générateurs de furfural (Duffau, 1946; Cerning et Guilbot, 1973), des teneurs en glucose (Lloyd et Whelan, 1969) et en acides uroniques (Dische, 1947; Mc Comb et Mc Cready, 1952).

Parallèlement aux déterminations quantitatives, la caractérisation des oses présents dans les hydrolysats chlorhydriques et sulfuriques est effectuée par chromatographie sur couche mince de gel de silice (De Stefanis et Ponte, 1968).

Quelle que soit la méthode de dosage retenue — conventionnelle ou par hydrolyses acides successives — les résultats sont rapportés à 100 g d'échantillon initial sec.

L'importance de la fraction membranaire des pailles de blé a été estimée par différence après détermination des composants non glucidiques — matières minérales et matières protéiques (N × 6,25) — et des oses et oligosides de faibles poids moléculaires. Ceux-ci sont extraits par l'éthanol à 80 ° et dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique (Remington, 1940; Tollier et Robin, 1979).

## Résultats et discussion

Les membranes représentent 80 à 90 p. 100 de la matière sèche des pailles (tabl. 1). Les teneurs en matières protéiques brutes ainsi qu'en oses et oligosides de faibles poids moléculaires sont peu élevées et relativement constantes (respectivement 1 à 3 et 2 à 3 p. 100). L'augmentation de la teneur en matières minérales totales observée après traitement à la soude correspond en grande partie à l'augmentation de la teneur en sodium. Il est intéressant de noter que les quantités de matières sèches présentes dans les extraits éthanoliques obtenus à partir des pailles traitées sont nettement plus élevées que celles des pailles témoins. Les teneurs en oses et matières protéiques restant constantes, on peut penser que la soude entraîne l'altération de certains constituants membranaires type petits polyphénols libérés lors de l'extraction éthanolique.

TABLEAU I

*Estimation de la fraction membranaire des pailles de blé traitées ou non à la soude (résultats rapportés à 100 g d'échantillon initial sec)*

| | Blé 1 | | Blé 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Témoin | TVH | Témoin | TVS | TVH |
| Matières minérales | 9,8 | 16,1 | 5,4 | 8,4 | 11,0 |
| Matières protéiques (N × 6,25) | 3,5 | 3,6 | 2,5 | 1,9 | 2,6 |
| Matières sèches(*) | 9,1 | 16,0 | 9,4 | 16,3 | 18,7 |
| Oses(*) | 1,1 | 1,3 | 2,5 | 2,4 | 2,5 |
| Matières protéiques(*) (N × 6,25) | 2,3 | 1,9 | 1,2 | 1,1 | 1,7 |
| Membranes | 85,6 | 62,0 | 89,3 | 87,3 | 83,9 |

(*) solubles dans l'éthanol 80°

*Étude de la fraction hémicelluloses*

La teneur en hémicelluloses selon VAN-SŒST est la différence entre la valeur « hémicelluloses + cellulose + lignine » de la « fibre au détergent neutre » (neutral détergent fiber ou NDF) et de la valeur « cellulose + lignine » de la « fibre au détergent acide » (acid detergent fiber ou ADF). Cette différence est symbolisée par $(NDF - ADF)_1$ lorsque la teneur en « cellulose + lignine » a été évaluée à partir de l'échantillon initial et par $(NDF - ADF)_2$ lorsque la teneur en « cellulose + lignine » a été évaluée à partir d'un résidu NDF; ceci afin d'éliminer l'interférence des substances pectiques et des tanins avec le réactif au détergent acide. On constate que la teneur en hémicelluloses des pailles de blé varie de 25 à 30 p. 100. Ce pourcentage est nettement plus faible après traitement à la soude, principalement lorsque celui-ci est effectué par voie humide (20 à 25 p. 100). D'autre part, on peut noter que les valeurs en hémicelluloses obtenues par la différence $(NDF - ADF)_2$, c'est-à-dire lorsque la teneur en ADF est évaluée à partir d'un résidu NDF, sont sensiblement plus élevées que les valeurs obtenues par la différence $(NDF - ADF)_1$.

La quantité de matière organique solubilisée par l'acide chlorhydrique 0,7 N, pendant 5 h, à 96 °C, à partir des résidus de l'extraction éthanolique et évaluée pondéralement est de 35 à 40 p. 100 (tabl. 2).

La chromatographie sur couche mince des hydrolysats chlorhydriques neutralisés montre que cette fraction est principalement constituée de pentoses (xylose et arabinose) et d'hexoses (glucose et galactose). Les méthodes de dosage des principaux oses libérés au cours de l'hydrolyse chlorhydrique 0,7 N permettent de préciser que les pentoses, évalués après déshydratation en furfural et exprimés en xylose représentent 55 à 65 p. 100 de la matière organique sèche des hémicelluloses des pailles, le glucose non cellulosique et les acides uroniques respec-

TABLEAU 2

*Proportions des constituants solubilisés dans HCl 0,7 N pendant 5 h à 96 °C à partir des résidus de l'extraction éthanolique (résultats rapportés à 100 g d'échantillon initial sec)*

| | Blé 1 | | Blé 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Témoin | TVH | Témoin | TVS | TVH |
| Matière organique . . . . . | 34,9 | 32,0 | 40,7 | 35,1 | 35,0 |
| Générateurs de furfural (GF) . . . . . | 22,0 | 19,4 | 23,9 | 20,7 | 19,4 |
| Acides uroniques (AU) . . . . . | 3,3 | 2,6 | 4,0 | 3,8 | 3,2 |
| Glucose (Glc) . . . . . | 2,8 | 1,9 | 3,4 | 3,2 | 2,9 |
| Total . . . . . | 28,1 | 23,9 | 31,3 | 27,7 | 25,5 |

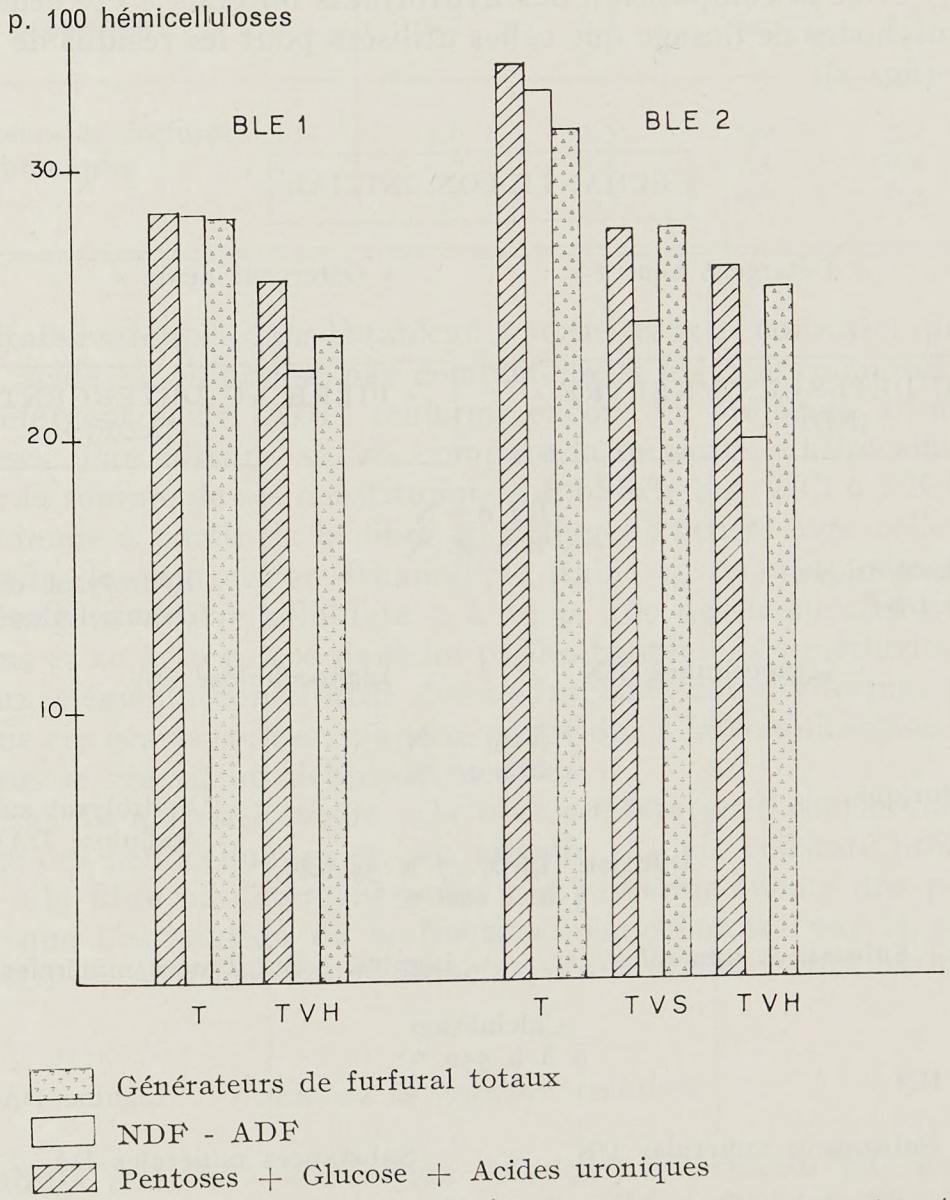



FIG. 1. — *Estimation de la teneur en hémicelluloses en fonction du type de méthode utilisée (Résultats rapportés à 100 g d'échantillon initial sec)*

tivement 8 à 9 et 9 à 10 p. 100. Ces 2 dernières valeurs varient peu, que les pailles aient été traitées ou non. Par contre, on note une diminution de 5 à 10 p. 100 de la teneur en générateurs de furfural dans les pailles après traitement à la soude.

En plus de la détermination globale de la teneur en hémicelluloses à partir des méthodes de VAN-SŒST et du dosage des principaux constituants solubilisés dans l'acide chlorhydrique 0,7 N (tabl. 2) on a effectué une détermination de la teneur en générateurs de furfural directement à partir de l'échantillon initial (générateurs de furfural totaux, GFT). La concordance entre cette dernière estimation (GFT) et la somme des constituants dosés à partir de l'hydrolysat chlorhydrique (GF + AU + Glc) est bonne, que les pailles aient été traitées ou non à la soude (fig. 1). Par contre, les méthodes globales selon VAN-SŒST fournissent des résultats beaucoup plus variables. On constate toutefois une nette diminution de la teneur en hémicelluloses dans les pailles traitées, ceci quelle que soit la méthode de dosage utilisée. Ce fait pourrait amener à penser que ce sont effectivement les hémicelluloses qui ont été dégradées lors du traitement.

La méthode d'estimation de la fraction hémicelluloses selon VAN-SŒST (NDF — ADF)$_1$ étant indépendante de la nature du substrat, il a été entrepris l'analyse systématique des « fibres au détergent neutre » (NDF) et des « fibres au détergent acide » (ADF)$_1$. Pour cela, chacun de ces 2 résidus a été soumis à l'hydrolyse chlorhydrique 0,7 N et la composition des hydrolysats obtenus a été étudiée à l'aide des mêmes méthodes de dosage que celles utilisées pour les résidus de l'extraction éthanolique (fig. 2).

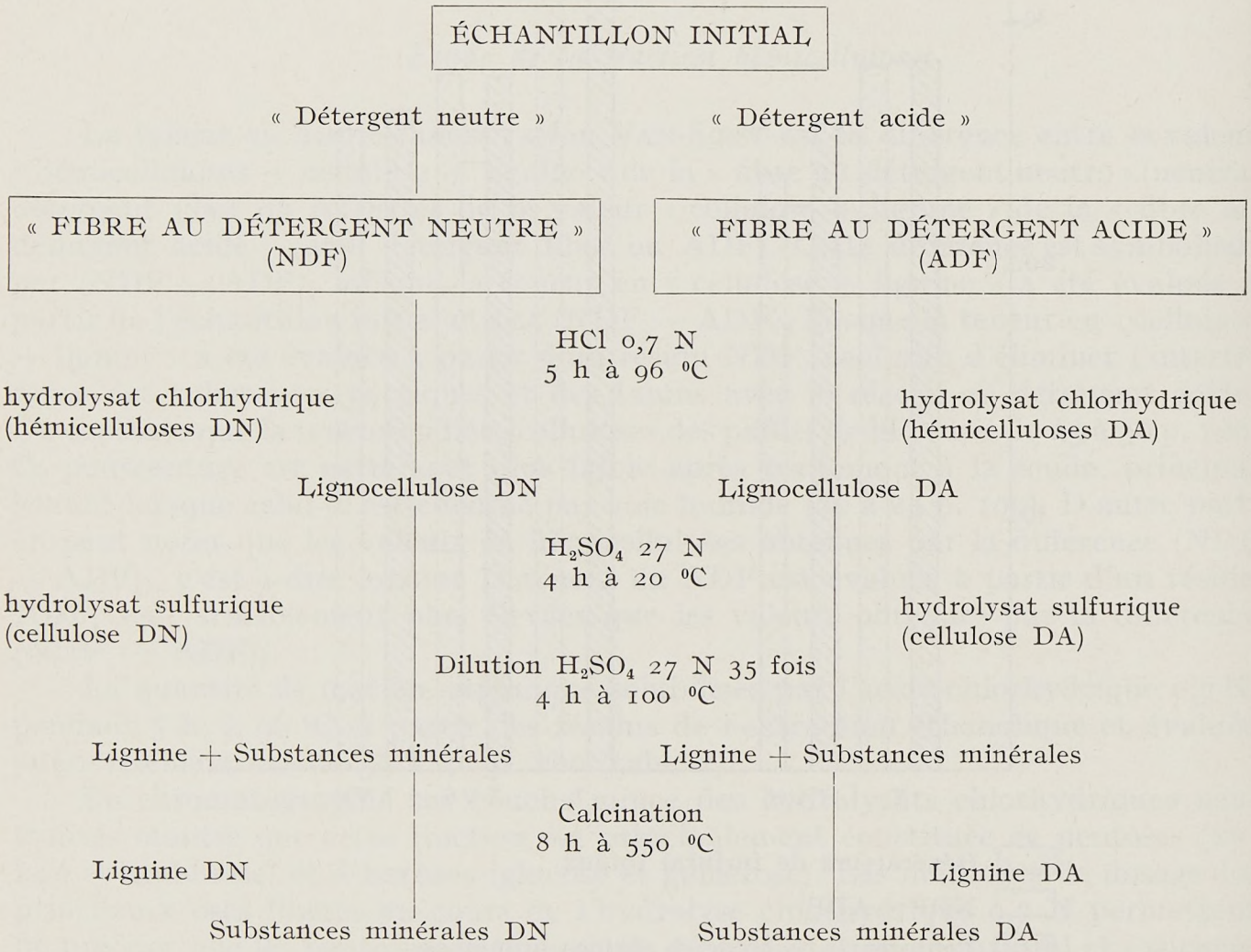



FIG. 2. — *Schéma d'analyse de la « fibre au détergent neutre » et de la « fibre au détergent acide » par hydrolyses acides successives*

TABLEAU 3

*Proportions des constituants solubilisés par HCl 0,7 N pendant 5 h à 96 °C à partir de la fibre au détergent neutre (NDF) et de la fibre au détergent acide (ADF) (résultats rapportés à 100 g d'échantillon initial sec)*

| | | Blé 1 | | Blé 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Témoin | TVH | Témoin | TVS | TVH |
| | Matière organique . . . . . | 34,3 | 25,8 | 37,0 | 27,6 | 24,2 |
| NDF | Générateurs de furfural . . . . | 21,9 | 19,0 | 22,3 | 18,2 | 18,4 |
| | Acides uroniques . . . . . | 2,3 | 1,2 | 3,7 | 2.9 | 2,6 |
| | Glucose . . . . . | 2,1 | 1,1 | 2,6 | 2,5 | 1,9 |
| | Total . . . . . | 26,3 | 21,3 | 28,6 | 23,6 | 20,9 |
| | Matière organique . . . . . | 9,8 | 6,6 | 5,0 | 7,6 | 6,4 |
| ADF | Générateurs de furfural . . . . | 3,6 | 3,3 | 3,0 | 3,6 | 3,6 |
| | Acides uroniques . . . . . | 0,7 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,5 |
| | Glucose . . . . . | 1,5 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,4 |

Les résultats regroupés dans le tableau 3 permettent de constater que le réactif au détergent acide ne solubilise pas complètement les hémicelluloses. En effet, la fibre au détergent acide (ADF) renferme encore, en moyenne, 10 à 15 p. 100 d'hémicelluloses. Par ailleurs, si l'on compare la quantité d'hémicelluloses — représentée par la somme de ses constituants solubilisés dans HCl 0,7 N (GF + AU + Glc) — obtenue à partir de la fibre au détergent neutre avec celle obtenue à partir du résidu de l'extraction éthanolique (tabl. 2), on peut admettre que le réactif au détergent neutre solubilise 7 à 10 p. 100 des hémicelluloses dans les pailles témoins et 10 à 20 p. 100 dans les pailles traitées. Les méthodes de dosage des principaux éléments constitutifs des hydrolysats chlorhydriques permettent de préciser que ces écarts sont en majeure partie dus à la solubilisation des acides uroniques dans le réactif au détergent neutre.

Dans le cas du matériel étudié, « la fibre au détergent neutre » ne renferme pas la totalité des hémicelluloses et, par ailleurs, il a été constaté précédemment (tabl. 3) que « la fibre au détergent acide » en renferme encore une partie. Il en résulte donc que l'estimation de la fraction hémicelluloses par la méthode de VAN-SŒST (NDF — ADF) se trouve entachée d'une double erreur par défaut.

### *Étude de la fraction cellulose*

Les résultats relatifs à la fraction cellulose, déterminés par les méthodes conventionnelles de WEENDE, de VAN-SŒST et par la méthode à l'acide formique sont représentés sous forme d'histogrammes (fig. 3). Dans le cas particulier de

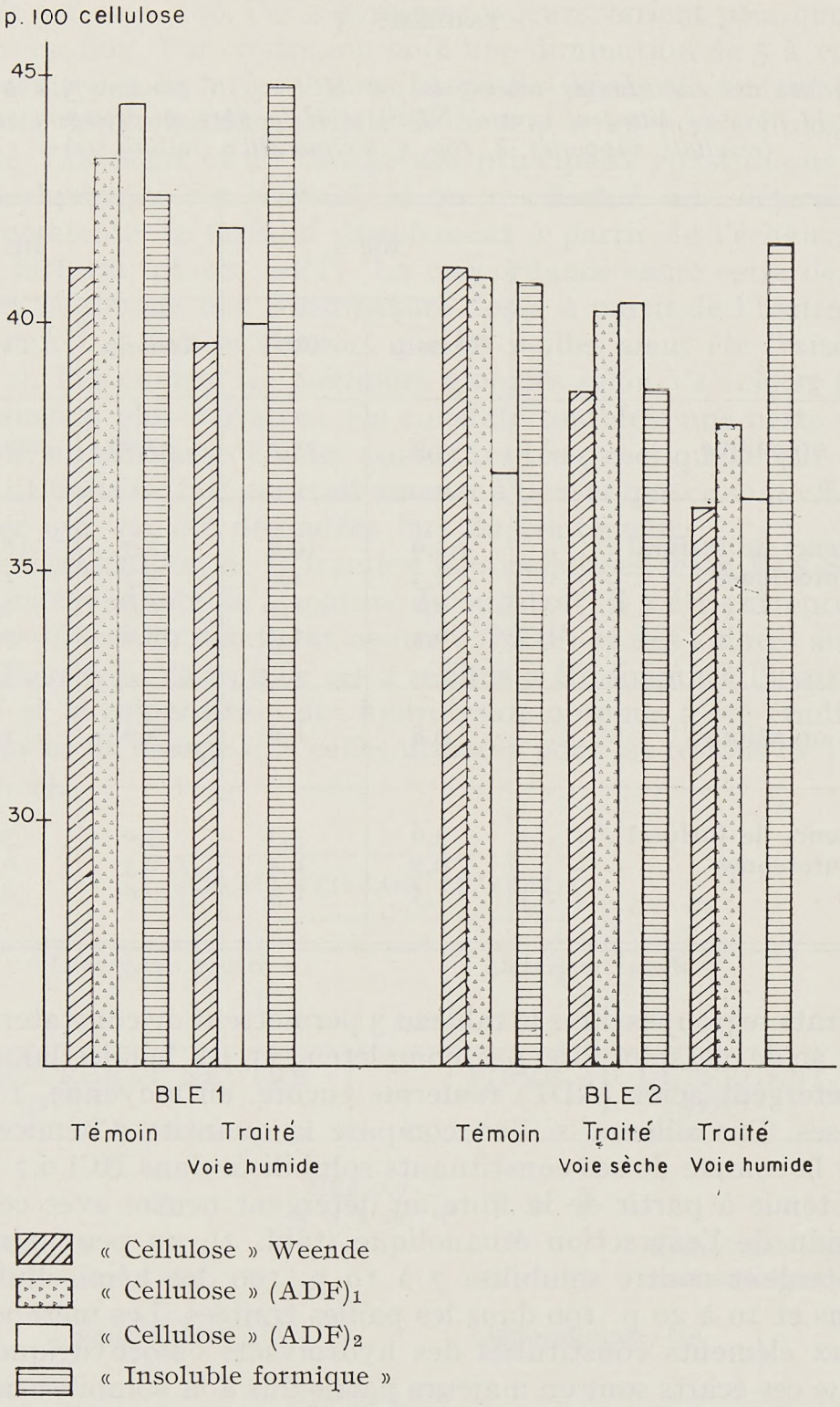



FIG. 3. — *Teneurs en cellulose des pailles de blé traitées ou non par la soude en fonction du type de méthode utilisée (résultats rapportés à 100 g d'échantillon initial sec)*

la méthode selon VAN-SŒST, les valeurs en cellulose sont évaluées pondéralement à partir des résidus lignocellulose. Ces derniers sont obtenus après action du réactif au détergent acide sur l'échantillon initial d'une part $(ADF)_1$ et sur le résidu NDF d'autre part $(ADF)_2$. On constate que les pailles de blé, traitées ou non, renferment environ 10 p. 100 de cellulose, ceci quelle que soit la méthode utilisée. Il est intéressant de noter également que la concordance entre ces valeurs obtenues par des techniques d'estimation globale est bonne. Les écarts existant entre les teneurs en cellulose des pailles témoins et des pailles après traitement à la soude, ne sont guère significatifs, compte tenu de la spécificité propre à chacune de ces méthodes.

Une caractérisation plus exacte de la nature du résidu obtenu dans le cas de la méthode VAN-SŒST a été entreprise pour tenter de discerner les causes d'erreurs que cette technique peut entraîner l'évaluation de la cellulose. Dans cette optique, de la même façon que dans les résidus « lignocellulose » résultant de l'hydrolyse acide selon SALO à partir de l'échantillon initial, les résidus «lignocellulose» obtenus après hydrolyse chlorhydrique 0,7 N de la fibre au détergent neutre $(LC)_{NDF}$ et de la fibre au détergent acide $(LC)_{ADF}$ ont été soumis à l'hydrolyse sulfurique (fig. 2).

La quantité de matière organique solubilisée par l'acide sulfurique et évaluée pondéralement à partir des résidus « lignocellulose » est de 35 à 40 p. 100, que les pailles aient été traitées ou non à la soude (tabl. 4). Les écarts observés entre la mesure du pouvoir réducteur, (exprimée en glucose), des hydrolysats sulfuriques neutralisés et le dosage spécifique du glucose par le système enzymatique glucose-oxydase /peroxydase, indiquent que cette fraction n'est pas constituée exclusivement de glucose. Une détermination des substances génératrices de furfural révèle en effet des traces de pentoses (environ 5 p. 100 de la matière organique présente dans l'hydrolysat sulfurique). Il pourrait s'agir de polyosides de structure type « hémicelluloses », qui, liés de façon covalente à la cellulose, ne seraient pas libérés au cours de l'hydrolyse en milieu chlorhydrique 0,7 N.

TABLEAU 4

*Proportions des constituants solubilisés par $H_2SO_4$ 27 N à partir des résidus lignocellulose obtenus après hydrolyse chlorhydrique (résultats rapportés à 100 g d'échantillon initial sec)*

| | | Blé 1 | | Blé 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Témoin | TVH | Témoin | TVS | TVH |
| | Matière organique . . . . . | 39,6 | 38,5 | 42,0 | 40,8 | 38,1 |
| (LC) et OH | Pouvoir réducteur . . . . . | 38,5 | 34,2 | 32,7 | 33,8 | 34,2 |
| | Glucose . . . . . | 31,4 | 31,9 | 31,9 | 31,0 | 30,0 |
| | Générateurs de furfural . . | 0,7 | — | 1,7 | 1,0 | 0,8 |
| | Matière organique . . . . . | 36,4 | 37,7 | 40,5 | 38,0 | 37,5 |
| (LC) NDF | Pouvoir réducteur . . . . . | 33,1 | 32,7 | 35,6 | 37,0 | 33,9 |
| | Glucose . . . . . | 29,1 | 28,8 | 33,0 | 33,9 | 32,8 |
| | Générateurs de furfural . . | — | — | 2,2 | 1,6 | 0,7 |
| | Matière organique . . . . . | 36,4 | 36,6 | 38,5 | 35,8 | 37,1 |
| (LC) ADF | Pouvoir réducteur . . . . . | 33,6 | 31,6 | 33,7 | 35,0 | 38,7 |
| | Glucose . . . . . | 30,6 | 28,0 | 31,7 | 32,3 | 32,2 |
| | Générateurs de furfural . . | 0,7 | — | 1,7 | 0,8 | 0,8 |

L'identification par chromatographie sur couche mince des éléments constitutifs des hydrolysats sulfuriques neutralisés montre en effet que si le glucose est le composant prédominant, il existe aussi de faibles quantités de xylose et, dans tous les cas, des traces de cellobiose. Ce fait prouve que l'hydrolyse de la cellulose de ce matériel biologique n'est pas complète dans les conditions du protocole de SALO.

Cette analyse permet également de constater que le glucose représente environ 80 p. 100 de la matière organique des hydrolysats sulfuriques, quelle que soit l'origine du résidu lignocellulosique (échantillon initial, fibres aux détergents neutre et acide). Ainsi, il semble que les réactifs aux détergents neutre et acide préservent l'intégrité de la cellulose.

Par ailleurs, il est nécessaire de souligner que le traitement des pailles par la soude ne semble pas avoir de répercussions notables sur les teneurs en cellulose exprimées en glucose. On note parfois une légère augmentation, mais celle-ci proviendrait vraisemblablement d'une meilleure « accessibilité » de la cellulose par les agents de dégradation après traitement des pailles à la soude (JOUANY, 1975).

## *Étude de la fraction lignine*

Dans le cas des méthodes mises en œuvre au cours de cette étude, la lignine est le résidu final obtenu après hydrolyse acide de la « lignocellulose ». De ce fait (tabl. 5) les teneurs en lignine brute sont très fluctuantes selon la technique utilisée. Le fractionnement par hydrolyses acides successives selon SALO effectué à partir de la « fibre au détergent acide » laisse un résidu lignine dont la teneur est nettement inférieure à celle obtenue soit à partir d'un résidu de l'extraction éthanolique, soit à partir de la fibre au détergent neutre (respectivement 4, 8 et 6 p. 100 en

TABLEAU 5

*Détermination de la teneur en lignine brute en fonction du type de méthode utilisée (résultats rapportés à 100 g d'échantillon initial sec).*

| | Blé 1 | | Blé 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Témoin | TVH | Témoin | TVS | TVH |
| $(L_{DA})_1$ | 6,4 | 7,3 | 6,0 | 6,5 | 7,5 |
| $(L_{DA})_2$ | 5,0 | 3,8 | 2,9 | 4,0 | 3,7 |
| $L_{Salo}$ et OH | 10,0 | 8,8 | 6,2 | 6,6 | 6,7 |
| $L_{Salo}$NDF | 9,0 | 8,3 | 4,4 | 6,8 | 5,0 |
| $L_{Salo}$ADF | 4,9 | 5,6 | 2,8 | 3,5 | 4,0 |

$(L_{DA})_1$ = Teneur en lignine déterminée à partir d'un résidu ADF résultant du l'action du détergent acide sur l'échantillon initial.
$(L_{DA})_2$ = Teneur en lignine déterminée à partir d'un résidu ADF résultant de l'action du détergent acide sur un résidu NDF.
$L_{Salo}$ et OH = Lignine : résidu obtenu après fractionnement selon Salo à partir du résidu de l'extraction éthanolique.
$L_{Salo}$NDF = Lignine : résidu obtenu après fractionnement selon Salo à partir du résidu NDF.
$L_{Salo}$ADF = Lignine : résidu obtenu après fractionnement selon Salo à partir du résidu ADF.

moyenne). Le même phénomène peut être observé lors de la détermination de la lignine à partir de la lignocellulose de VAN-SŒST.

Ainsi qu'EDWARDS (1972) l'a déjà souligné, il est possible que le réactif au détergent acide solubilise une partie de la lignine. Par ailleurs, il ne semble pas que le traitement des pailles avec 5 p. 100 de soude ait de répercussions notables sur la teneur en lignine, mais ce fait doit être considéré avec prudence compte tenu de la variabilité des résultats obtenus.

## Conclusion

L'étude des polyosides membranaires des pailles de blé, traitées ou non à la soude, a fourni 2 types de résultats. Il s'agit d'une part de la comparaison de méthodes permettant de déterminer les teneurs en hémicelluloses, cellulose et lignine des pailles et, d'autre part, de préciser les répercussions que le traitement à la soude peut entraîner dans l'importance respective de ces fractions.

La matière organique solubilisée dans HCl 0,7 N (fraction « hémicelluloses ») représente 35 à 40 p. 100 de la matière sèche des pailles de blé; un écart d'environ 20 p. 100 peut être noté entre cette valeur et la somme des principaux constituants de cette fraction (xylose, glucose, acides uroniques). Les teneurs en hémicelluloses déterminées à l'aide des méthodes conventionnelles de VAN-SŒST et exprimées par la différence « NDF — ADF » sont plus faibles. Par l'analyse des résidus ADF et NDF on constate en effet, d'une part que 10 à 15 p. 100 des hémicelluloses demeurent dans la « fibre au détergent acide » et d'autre part, que le réactif au détergent neutre en solubilise environ 10 p. 100. A partir de ces observations, il est possible de conclure que la différence « NDF - ADF » sous-estime la fraction hémicelluloses des pailles de blé.

Quelle que soit la méthode de dosage mise en œuvre, il semble que le traitement des pailles à la soude entraîne une nette diminution de leur teneur en hémicelluloses. La méthode de fractionnement selon SALO montre que cette diminution est en majeure partie due à la solubilisation de pentoses lors du traitement à la soude, principalement lorsque celui-ci est effectué par voie humide.

La fraction cellulose représente 35 à 40 p. 100 de la matière sèche des pailles de blé. Ce taux reste relativement constant, que les pailles de blé soient traitées ou non à la soude. Les différentes techniques de dosage mises en œuvre apportent des valeurs très semblables. Toutefois, dans le cas du matériel végétal étudié, aucune de ces méthodes n'aboutit à l'obtention d'une cellulose pure. Celle-ci renferme toujours une quantité faible mais constante (1 à 2 p. 100 de la matière organique) de pentoses. La présence de ces derniers dans l'hydrolysat sulfurique du fractionnement acide de SALO à partir d'un résidu ADF permet de formuler l'hypothèse que ces pentoses résiduels sont liés de façon covalente à la cellulose.

Les teneurs en lignine brute paraissent très dépendantes du type de dosage utilisé. Résidu final d'un certain nombre de manipulations, les valeurs de ce constituant doivent être examinées avec prudence. Il est toutefois possible de remarquer que le traitement des pailles de blé avec 5 p. 100 de soude a peu de répercussions sur leurs teneurs en lignine.

L'ensemble de ces résultats laisse à penser que la détermination de la fraction hémicelluloses par la somme de ses principaux constituants solubilisés dans l'acide chlorhydrique est la mieux adaptée pour caractériser cette fraction. Toutefois, dans le cas du matériel végétal étudié, l'hydrolyse chlorhydrique 0,7 N pendant

5 h à 96 °C n'est pas suffisante pour extraire la totalité des pentoses, une certaine quantité reste imbriquée dans le résidu « lignocellulose ». Les teneurs en cellulose déterminées par la mesure du pouvoir réducteur de l'hydrolysat sulfurique ou à partir de la lignocellulose de VAN-SŒST sont équivalentes, et dans les deux cas, les résidus « cellulose » ne sont pas uniquement constitués de cellulose. Par ailleurs, il est difficile de tirer une conclusion quant à la détermination de la lignine; tous les résultats semblent très dépendants de la méthode de dosage utilisée.

L'ensemble de cette étude et les résultats qui en découlent montrent que la méthode de fractionnement, par hydrolyses acides successives, présente l'avantage de pouvoir préciser les variations éventuelles de la composition de chacun des hydrolysats chlorhydriques ou sulfuriques après traitement à la soude des pailles. Il n'y a aucun doute que la soude solubilise une partie des pentoses et notamment du xylose, composant hémicellulosique dont le cœfficient d'utilisation digestive est faible (SALO, 1977). Il est également probable que la soude entraîne l'élimination de petits composés phénoliques — type acide férulique — et augmente ainsi la digestibilité des pailles traitées (HARTLEY et JONES, 1978).

Ce travail qui peut être considéré comme une première approche demande à être poursuivi et approfondi. De nombreux points sont encore à éclaircir et tout particulièrement la fraction pentoses. Dans cette optique la méthode de fractionnement décrite par SALO nécessite d'être reconsidérée et modifiée de façon à être mieux adaptée au matériel végétal étudié.

*Reçu pour publication en décembre 1979.*

## Summary

*Polysaccharides of cereal straws treated by NaOH*

Cereal straws-mainly contain cellulose and hemicelluloses associated with variable amounts of lignin — are inefficiently used by ruminants because of their low digestibility. Consequently two experiments were conducted to observe effects of various chemical treatments, with emphasis NaOH, upon the nutritive value of ground wheat straw.

A study was designed to compare the effects of NaOH treatment on the cell-wall polysaccharides cellulose and hemicelluloses. These different fractions were evaluated by several techniques (formic acid insoluble matter, neutral and acid detergent fiber and successive acid hydrolysis according to SALO). While the treatment of wheat straw with NaOH had no appreciable effect on cellulose content, a decrease of the amount of hemicelluloses was observed. The results obtained by acid hydrolysis suggest that some furfural generators were solubilized by the treatment.

Our work on cell wall polysaccharides has to be considered as an initial investigation. Further studies using more specific methods are necessary to provide more information.

## Références bibliographiques

BRAMAW W. L., ABE R. K., 1977. Laboratory and *in vivo* evaluation of nutritive value of NaOH treated wheat straw. *J. Anim. Sci.*, **46**.

CAPPER B. S., MORGAN D. J., 1977. Alkali treated roughages for feeding ruminants. *Tropical Science*, **19**.

CERNING J., GUILBOT A., 1973. A specific method for the determination of pentosans in cereals and cereal products. *Cereal Chem.*, **50**, 176-184.

DE STEFANIS V. A., PONTE J. G., 1968. Separation of sugar by thin layer chromatography. *J. of Chromatog.*, **34**, 116-120.

DISCHE Z., 1947. A new specific color reaction of hexuronic acid. *J. Biol. Chem.*, **167**, 189-198.

DUFFAU F., 1946. Nouvel appareil à entraînement par la vapeur. Application au micro-dosage des générateurs de furfural par une technique colorimétrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **28**, 10-12.

EDWARDS C. S., 1972. Determination of lignin and cellulose in forages by extraction with triethylene glycol. *J. Sci. Fd. Agric.*, **24**, 381-388.

GUILLEMET R., PRECEPTIS P., 1942. Le dosage de la cellulose par dissolution formique de l'amidon et des protéines. *Acad. Agric. France*, **28**, 383-386.

HARTLEY R. D., JONES E. C., 1978. Phenolic components and degradability of cell walls of the brown Hibrid mutant *bm*$_3$ of *Zm. J. Sci. Fd. Agric.*, **29**, 778-789.

HUGGET A. S., NIXON D. A., 1957. Enzymatic determination of blood glucose. *Biochem. J.*, **68**, 12.

JOUANY J. P., 1975. Étude des traitements permettant d'améliorer la valeur alimentaire des fourrages « pauvres » (pailles). *Bull. CRZV de Theix*, **21**, 5-15.

LLOYD J. B., WHELAN W. J., 1968. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. *Anal. Biochem.*, **30**, 467-470.

MC COMB E. A., MC CREADY R. M., 1952. Colorimetric determination of pectic substances. *Anal. Chem.*, **24**, 1630-1632.

NELSON N., 1944. Photometric adaptation of somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **183**, 375.

OLOLADE B. G., MOWAT D. N., 1978. The effect of processing methods on the *in vitro* digestibility of sodium hydroxide treated routhage. *Can. Journ. Anim. Sci.*, **50**, 557-662.

REMINGTON C., 1940. Ceromucoid and the bound carbohydrate of the serum proteins. *Biochem. J.*, **34**, 931-939.

REXEN F., MOLLER M., 1974. Use of chemical methods to improve the nutritional value of straw crops. *Feedstuffs*, **46**, 8.

SALO M. L., 1965. Determination of carbohydrate fraction in animal food and faeces. Suomen maatalons⁺icteellisen seuran julk., 105, acte agralia fennica.

SALO M. L., 1977. Carbohydrate composition and nutritive value of forage.

TOLLIER M. T., ROBIN J. P., 1979. Adaptation de la méthode à l'orcinol sulfurique aux dosages automatiques de glucides neutres totaux. Conditions d'application aux extraits d'origine végétale. *Ann. Technol. Agric.*, **28**, 1 15.

VAN-SŒST P. J., 1963. Use of detergent in the analysis of fibrous feed. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J.A.O.A.C.*, **46**, 829-835.

VAN-SŒST P. J., WINE R. H., 1967. Use of detergent in the analysis of fibrous feed. IV. Determination of plant cell wall constituants. *J.A.O.A.C.*, **50**, 50-55.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (4), 371-385.

# Méthode d'étude et d'utilisation d'une technique d'analyse biaisée sur analyseur automatique Application au dosage de l'acide galacturonique

M. SOUTY (*), M. BURET (*), Camille DUBY (**), F. LAPIZE (*), P. FERRY (*)

(*) *Station de Technologie des Produits Végétaux*
*Centre de Recherches d'Avignon, I.N.R.A.*
*84140 Montfavet*

(**) *Station de Biométrie*
*Centre National de Recherches Agronomiques, I.N.R.A.*
*78000 Versailles*

## Résumé

De nombreux dosages effectués sur appareil à flux continu utilisent l'acide sulfurique pur. Or, lorsqu'on analyse des échantillons de concentrations très différentes dans un ordre aléatoire, on constate la présence d'un biais, dû sans doute à la pollution d'un échantillon sur le suivant, à cause de la grande viscosité de l'acide sulfurique.

On peut minimiser ce biais en doublant systématiquement chaque échantillon ou en augmentant les temps de pompage de l'échantillon et de l'eau de rinçage, au détriment de la cadence d'analyse.

Mais il est peut-être préférable de chercher à estimer ce biais. Les résultats du dosage obtenus, corrigés du biais, seront alors nettement améliorés, sans avoir à diminuer la cadence d'analyse.

C'est cette dernière solution que nous avons étudiée et appliquée à propos du dosage de l'acide galacturonique par le carbazol.

De plus, ce dosage a été rendu sensible et pratique par une modification du circuit analytique (manifold) et de la concentration du réactif utilisé.

La méthodologie utilisée ici pour l'étude du biais devrait pouvoir servir lors de l'emploi d'autres techniques biaisées.

Mots clés : *analyse automatique, biais, acide galacturonique*

## Introduction

Les substances pectiques sont des macromolécules constituées essentiellement d'unités d'acide galacturonique liées en longues chaînes par des liaisons osidiques $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) et partiellement méthoxylées sur les carboxyles. Ces substances pectiques sont des constituants importants des organes végétaux. Elles jouent un

rôle notamment dans la fermeté des tissus : leur dégradation au cours de la maturation des fruits, ou durant les traitements technologiques, conduit à étudier trois fractions qui ont des caractères propres et un rôle bien précis sur la cohésion des tissus :

— les acides pectiniques, ou pectine soluble, facilement solubles,
— les acides pectiques, ou pectates, peu ou pas solubles,
— la protopectine, forme native et insoluble de ces substances.

Les études sur les substances pectiques impliquent la détermination de ces différentes formes. Ceci nécessite d'abord l'isolement spécifique de chacune d'elles, puis leur dosage proprement dit.

Les méthodes de dosage de ces substances, après leur isolement, consistent, soit à la détermination titrimétrique des fonctions carboxyliques libres avant et après saponification, soit à la détermination colorimétrique de l'acide galacturonique. Le carbazol est alors le réactif généralement le plus utilisé. Ce réactif employé depuis Dische (1947) a fait l'objet de nombreuses études portant sur sa spécificité et de multiples adaptations et variantes du mode opératoire ont déjà été proposées. Les travaux poursuivis dans notre laboratoire nous ont amenés à mettre en œuvre la méthode de Mc Comb et Mc Cready (1952) puis celle de Dietz et Rouse (1953). Cette dernière, plus sensible que la précédente, est d'autant plus digne d'intérêt qu'elle est également plus simple et plus rapide. Si tous les échantillons sont traités de façon parfaitement identique, elle nous satisfait dans la majorité des cas. Pour de grandes séries, il paraît toutefois judicieux de disposer d'un dosage automatique.

Le présent travail a pour objet de présenter une technique de détermination de l'acide galacturonique par le carbazol sur un analyseur à flux continu. Une connaissance précise des caractéristiques de cette technique nous permet d'envisager son application dans de bonnes conditions.

Des montages sur analyseurs automatiques ont été proposés depuis plusieurs années (Balazs *et al.*, 1965; Johnson et Samuelson, 1966; Knee, 1973) mais ne semblent pas avoir été unanimement adoptés. Thibault et Robin (1975), Sarris *et al.* (1975) ont décrit chacun un montage différant quelque peu l'un de l'autre. Thibault et Robin (1975) transforment l'acide galacturonique en acide 5-formylfuroïque par chauffage en milieu sulfurique, puis font agir le carbazol. Sarris *et al.* (1975) procèdent au chauffage simultané de l'échantillon et du carbazol en milieu sulfurique, ce qui permet de diminuer le temps de réponse de la réaction, donc d'accélérer le rythme des analyses. L'un et l'autre introduisent dans le système le carbazol en solution dans l'acide sulfurique. Nous avons pu constater, en utilisant ces montages, que la sensibilité de la réaction était relativement faible : densité optique (D.O.) d'environ 0,3 pour une concentration de 100 microgrammes d'acide galacturonique par millilitre. De plus, comme l'ont souligné Thibault et Robin (1975), le carbazol, très sensible à l'oxydation perd rapidement de sa réactivité : la solution sulfurique prend une couleur verdâtre et la sensibilité peut varier tout au long d'une journée d'analyses.

Dans le cas du dosage manuel que nous pratiquons habituellement, le carbazol en solution éthanolique est introduit dans l'échantillon presque simultanément avec l'acide sulfurique. La réaction s'effectue en 5 min au bain-marie à 85 °C et on obtient une D.O. voisine de 1 pour 100 µg /ml d'acide galacturonique anhydre (AGA). La concentration de l'échantillon est calculée par comparaison avec les densités optiques obtenues avec une gamme étalon d'acide galacturonique traitée dans les mêmes conditions.

C'est ce processus opératoire que nous avons essayé de transposer aussi fidèlement que possible sur un analyseur automatique.

## Amélioration du dosage colorimétrique automatisé de l'acide galacturonique

### 1. — *Réactif*

Pour conserver sur automate à flux continu la même réactivité que manuellement, il paraît indispensable de ne pas préparer à l'avance le carbazol en solution sulfurique. JOHNSON et SAMUELSON (1966), BALAZS *et al.* (1965), utilisent le carbazol en solution alcoolique, comme dans les méthodes manuelles. Mais THIBAULT et ROBIN (1975), après KNEE (1973), indiquent avoir obtenu avec ces techniques un mauvais mélange du flux final.

Il est évident que la solution alcoolique de carbazol arrivant au contact de l'acide sulfurique subit un échauffement brutal qui provoque la cassure des bulles dans le circuit, la mauvaise répartition des segments liquides et des perturbations au niveau de la réaction. Afin de minimiser cet inconvénient, nous avons cherché à introduire le réactif dans le plus petit volume possible d'éthanol. Pour cela nous utilisons une solution contenant 0,8 g de carbazol dans 100 ml d'éthanol à 96 °GL, concentration inférieure à la limite de solubilité du carbazol dans l'éthanol à la température ambiante. Il n'y a donc point de difficultés particulières de ce côté-là.

### 2. — *Matériel utilisé*

Notre montage utilise un distributeur d'échantillons, une pompe proportionnante I et un bain thermostaté de marque Technicon. En bout de chaîne, nous disposons d'un spectrophotomètre Turner 330 équipé d'une cuve Hellma à flux continu avec débullage incorporé. L'information de sortie du spectrophotomètre est envoyée sur un enregistreur potentiométrique par l'intermédiaire d'un système de linéarisation en concentration et d'expansion éventuelle d'échelle, monté au laboratoire.

### 3. — *Description du montage analytique*

Le dispositif utilisé pour l'analyse (ou manifold) est représenté sur la figure 1.

A la sortie de la pompe, le carbazol est mis en contact avec l'acide sulfurique concentré préalablement segmenté par l'air. La proportion d'éthanol est de 1 pour 34 de $H_2SO_4$ pur. Dans ces conditions le flux final bullé de $H_2SO_4$ n'est pratiquement pas perturbé. De plus, l'introduction du carbazol s'effectue au moyen d'un té de raccordement en verre incliné de 45° vers le haut, ce qui permet d'éviter la cassure des bulles. Le mélange carbazol /$H_2SO_4$ est agité dans une bobine de mélange de 16 cm, puis les échantillons sont introduits à la cadence de 20 à l'heure. Après homogénéisation dans une bobine simple de 8 cm, le mélange séjourne 15 min dans un bain thermostaté à 98 °C. A la sortie du bain-marie. le flux, préalablement refroidi, est débullé et sa densité optique lue à 525 nanomètres.

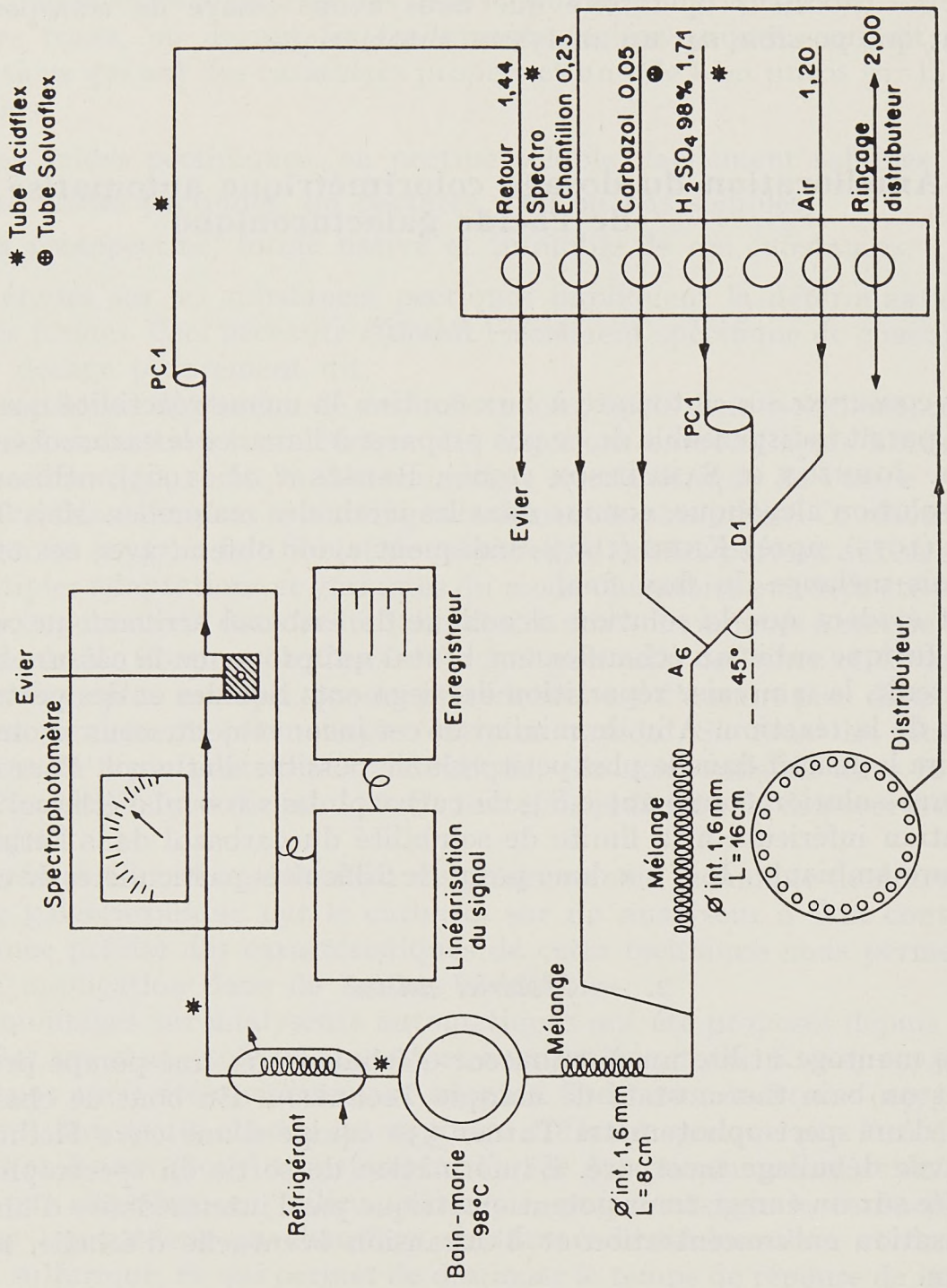



FIG. 1. — *Schéma du dispositif utilisé pour le dosage de l'acide galacturonique.*
(Les annotations : $PC_1$, $A_6$, $D_1$, se réfèrent à la nomenclature Technicon.)
Les temps de pompage sont respectivement de :
— 2 min pour l'échantillon
— 1 min pour l'eau de rinçage.

## 4. — *Étalonnage et expression des résultats*

A partir d'une solution mère contenant 100 mg/ml d'acide galacturonique anhydre sont préparées des solutions, contenant de 0 à 80 µg d'acide galacturonique anhydre (AGA) par ml, dont on mesure l'absorbance. Le zéro est effectué sur le flux $H_2SO_4$/carbazol. On obtient, dans nos conditions opératoires, une droite, ainsi qu'une sensibilité de dosage identique à celle obtenue lors des dosages manuels. La détermination de l'absorbance de l'échantillon permet ensuite d'en calculer la concentration par comparaison avec la droite d'étalonnage.

## Résultats des dosages automatisés

### 1. — *Précision de la méthode*

La précision de la méthode est estimée sur 6 solutions de concentrations connues différentes, à raison de 30 mesures consécutives par solution.

Dans ces conditions, la précision relative ($P_1$) que nous pouvons attendre d'un résultat pris isolément, bien que dépendant de la concentration de la solution mesurée, reste, dans le plus mauvais des cas, meilleure que ± 3 p. 100 (tabl. 1).

Lors du calcul des écarts-types de chaque série de mesures, la première de ces mesures a été éliminée car systématiquement différente de façon significative au seuil P = 0,05 de l'ensemble des 29 suivantes. Cette erreur systématique est due à un biais engendré sans doute par la grande viscosité de l'acide sulfurique.

TABLEAU I

*Estimation de la précision du dosage de l'acide galacturonique sur analyseur automatique*

$n$ = nombre de répétitions
$\bar{x}$ = moyenne des mesures
$(e.t)_x$ = écart-type des mesures

| Échantillon (µg/ml) | Répétitions ($n$) | Résultats de la mesure | | Précision d'un résultat isolé $P_1$ (%) |
|---|---|---|---|---|
| | | $\bar{x}$ | $(e.t)_x$ | |
| 10. . . . . | 29 | 9,94 | 0,12 | 2,6 |
| 20. . . . . | 29 | 20,11 | 0,23 | 2,3 |
| 30. . . . . | 29 | 30,20 | 0,15 | 1,0 |
| 40. . . . . | 29 | 40,55 | 0,16 | 0,8 |
| 50. . . . . | 29 | 49,46 | 0,20 | 0,8 |
| 60. . . . . | 29 | 59,54 | 0,24 | 0,8 |
| 70. . . . . | 29 | 69,77 | 0,28 | 0,8 |

Précision d'un résultat isolé : $P_1 = \frac{(e.t)_x . t \times 100}{\bar{x}}$ avec $t = 2{,}048$ pour $n - 1 = 28$, au seuil de P = 0,05 (LACROIX, 1962).

### 2. — *Influence de l'ordre de passage des échantillons*

Dans un premier essai, quelques échantillons sont mesurés systématiquement après un échantillon de concentration très différente. Les résultats du tableau 2 confirment l'existence d'un biais, soit par excès quand la solution analysée précédemment est supérieure à celle mesurée, soit par défaut dans le cas contraire.

TABLEAU 2

*Mise en évidence d'un biais dû à la mesure précédente*
*Estimation de la précision des résultats dans le cas où l'on néglige ce biais*

$n$ = nombre de répétitions
$\bar{x}$ = moyenne des mesures
$(e.t)_x$ = écart-type des mesures

| Échantillon ($\mu g$/ml) | Répétitions ($n$) | Résultats de la mesure | | Écart en % par rapport à la valeur théorique |
|---|---|---|---|---|
| | | $\bar{x}$ | $(e.t)_x$ | |
| 10 après 50 . . . . . | 6 | 12,42 | 0,66 | + 24,2 |
| 20 après 60 . . . . . | 5 | 22,10 | 0,89 | + 10,5 |
| 30 après 70 . . . . . | 6 | 31,67 | 0,41 | + 5,6 |
| 30 après 0 . . . . . | 6 | 29,33 | 0,61 | — 2,2 |
| 50 après 10 . . . . . | 6 | 47,83 | 0,26 | — 4,3 |
| 50 après 0 . . . . . | 5 | 47,30 | 0,27 | — 5,4 |
| 60 après 20 . . . . . | 4 | 58,63 | 0,85 | — 2,3 |
| 70 après 30 . . . . . | 6 | 67,75 | 0,69 | — 3,2 |
| 70 après 0 . . . . . | 7 | 65,64 | 0,69 | — 6,2 |

Dans ces conditions, nous pouvons nous demander ce que devient la précision d'une mesure lors du dosage d'un échantillon appartenant à une série de concentrations inconnues et dispersées. Par ailleurs, quelle est la signification d'un écart-type mesuré sur des résultats biaisés ?

Imaginons une série de mesures effectuées sur des solutions de concentrations connues, dont l'ordre de passage est aléatoire et regroupons les résultats obtenus sur la même solution.

Si l'on appelle :

$\mu$ la valeur réelle à mesurer
$X_i$ la $i^{eme}$ mesure de la valeur $\mu$
$\mu(p_i)$ la valeur de la solution précédant la valeur de $\mu$ qui donne $X_i$
$ß(\mu_{pi})$ le biais induit par la valeur précédente $\mu_{pi}$
$\varepsilon_i$ l'erreur aléatoire d'espérance nulle de la mesure de $X_i$,

le modèle de l'analyse est le suivant :

$$X_i = \mu + ß(\mu_{pi}) + \varepsilon_i$$

variance de $\varepsilon_i = \sigma^2$ quel que soit $i$. Les $\varepsilon_i$ sont non corrélés entre eux.

Si l'on calcule l'écart-type $(e.t)_x$ estimé sur les mesures $X_i (i = 1 \text{ à } k)$, nous avons :

$$(e.t)_x^2 = \frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^{k} (X_i - \bar{X})^2 = \frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^{k} \left[ \mu + ß(\mu_{pi}) + \varepsilon_i - \mu\bar{ß}(\mu_p) - \bar{\varepsilon} \right]^2$$

avec :

$$\bar{ß}(\mu_p) = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^{k} ß(\mu_{pi})$$

L'espérance (*) de cet écart-type est égale à :

$$E(e.t)_x^2 = \sigma^2 + \frac{1}{k-1}\sum_{i=1}^{k}\left[B(\mu_{pi}) - \bar{B}(\mu_p)\right]^2 \qquad (1)$$

Dans cette égalité, la deuxième partie du membre de droite est la variance des biais introduits dans la série d'analyse. Elle n'a aucun intérêt pour l'expérimentateur. En effet, ce qui nous importe, c'est l'écart à la vraie valeur $\mu$ et non l'écart à la valeur moyenne $\overline{X}$ biaisée. On pourra estimer la précision par l'écart quadratique moyen de X, noté $(e.q.m)_x$, tel que $(e.q.m)_x^2 = \frac{1}{k}\sum_{i=1}^{k}(X_i - \mu)^2$.

L'espérance de cet écart quadratique moyen est égale à :

$$E(e.q.m)_x^2 = \sigma^2 + \frac{1}{k}\sum_{i=1}^{k} B^2(\mu_{pi}) \qquad (2)$$

le terme $\frac{1}{k}\sum_{i=1}^{k} B^2(\mu_{pi})$ peut être considéré comme une erreur moyenne due au biais.

TABLEAU 3

Essai (A)

*Importance du biais dû à la pollution d'un échantillon sur le suivant lors du dosage automatisé de l'acide galacturonique*

*Estimation de la précision des résultats pour des échantillons distribués au hasard (avec* n = 30)

$(e.t.)_x$ = écart-type des mesures

$(e.q.m)_x$ = écart quadratique moyen des mesures

| Échantillon (µg/ml) | Résultats de la mesure avec | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Calcul de l'écart-type | | Calcul de l'écart quadratique moyen | |
| | $(e.t.)_x$ | $P_1$ (%) | $(e.q.m)_x$ | $P_1$ (%) |
| 10 | 0,949 | 20 | 2,112 | 43 |
| 20 | 0,692 | 7,2 | 1,429 | 15,5 |
| 30 | 0,585 | 3,9 | 0,992 | 7 |
| 40 | 0,742 | 3,8 | 0,734 | 3,7 |
| 50 | 0,677 | 2,8 | 0,666 | 2,7 |
| 60 | 0,854 | 2,9 | 1,300 | 4,5 |

(*) L'espérance d'une variable aléatoire est la moyenne de toutes les valeurs possibles de cette variable pondérées par les probabilités qu'elle prenne ces valeurs.

On peut montrer que l'espérance d'une variable aléatoire est la valeur limite de la moyenne de cette variable sur un échantillon dont la taille tend vers l'infini.

### 3. — *Influence du biais sur la précision d'une mesure*

Un essai (A) qui porte sur 30 répétitions non ordonnées de 6 échantillons de concentrations 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml est réalisé afin de vérifier l'influence de la prise en compte du biais des mesures dans l'estimation de la précision. A cet effet, une table de nombres au hasard (SNEDECOR et COCHRAN, 1971) a servi à tirer l'ordre de passage aléatoire de ces 180 échantillons. Après analyse, les résultats des échantillons correspondant à chaque concentration sont regroupés et la précision des résultats est estimée à partir des relations (1) et (2) (tabl. 3).

Ce tableau 3 montre l'importance de l'influence du biais. L'incertitude d'une mesure est par exemple deux fois plus grande lors de l'analyse d'un échantillon à la concentration 10 µg/ml que ne le laisserait supposer le calcul de l'écart-type des valeurs $X_i$ correspondantes. Les précisions relatives obtenues sont fortement liées aux concentrations mesurées et sont très faibles pour les solutions peu concentrées (10 et 20 µg/ml) quelle que soit la concentration de la solution précédente.

## Discussion

Lorsqu'on utilise une méthode d'analyse, il est nécessaire que sa précision soit adaptée aux problèmes que l'on veut résoudre. Si la précision d'une mesure unique est insuffisante, la répétition de celle-ci va accroître cette précision. Dans le cas du dosage des pectines, la répétition des mesures permet d'éliminer le biais dû à l'échantillon précédent (voir tabl. 1). Le recours systématique à une telle méthodologie enlève beaucoup d'intérêt à l'analyse automatisée car la vitesse d'obtention des résultats s'en trouve fortement réduite et leur coût augmenté. Cette technique risque alors de ne plus être compétitive avec le dosage manuel. Nous avons alors cherché à améliorer nos mesures au niveau de leur interprétation.

### 1. — *Correction du biais*

Une première amélioration de la méthode proposée peut être obtenue si l'on arrive à regrouper les échantillons en séries plus homogènes. En effet, l'influence du biais risque d'être moins forte. Ainsi, lors d'un essai (B) on a considéré 2 séries : 10, 20 et 30 µg/ml d'une part et 40, 50 et 60 µg/ml d'autre part; dans chaque série les échantillons ont été distribués au hasard par tirage comme dans l'essai (A), et analysés (tabl. 4).

La prise en considération du biais introduit par la mesure précédente, au moyen de la relation (2), reste indispensable pour une bonne estimation des résultats. En outre, dans ces conditions, on note un gain sensible de la précision, ainsi qu'il ressort de la comparaison des tableaux 3 et 4. Par exemple, la précision relative de la mesure d'une solution de concentration 10 µg/ml est alors ramenée de ± 43 à ± 12,5 p. 100.

Le regroupement préalable des échantillons à analyser suppose cependant la connaissance du matériel végétal étudié et risque d'être difficile à mettre en œuvre. Dans quelques cas cependant, lorsque l'expérimentation l'exige, une première série d'analyses peut permettre de repérer les échantillons fortement biaisés

TABLEAU 4

Essai (B)

*Importance du biais dû à la pollution d'un échantillon sur le suivant lors du dosage automatisé de l'acide galacturonique*

*Estimation de la précision des résultats pour des échantillons distribués au hasard à l'intérieur de 2 séries de concentrations voisines*

$(e.t)_x$ = écart-type des mesures

$(e.q.m)_x$ = écart quadratique moyen des mesures

| Échantillon (µg/ml) | Résultats de la mesure avec | | | |
|---|---|---|---|---|
| | calcul de l'écart-type | | calcul de l'écart quadratique moyen | |
| | $(e.t)_x$ | $P_1$ (%) | $(e.q.m)_x$ | $P_1$ (%) |
| 10 | 0,244 | 5 | 0,606 | 12,5 |
| 20 | 0,265 | 2,7 | 0,666 | 7 |
| 30 | 0,230 | 1,6 | 0,436 | 3 |
| 40 | 0,280 | 1,5 | 0,727 | 3,7 |
| 50 | 0,304 | 1,3 | 0,740 | 3 |
| 60 | 0,921 | 3,2 | 0,939 | 3,2 |

et une répétition de la mesure peut alors être effectuée pour ces seuls échantillons.

Une deuxième manière d'améliorer la méthode peut être obtenue si l'on arrive à estimer correctement le biais $B(\mu_{pi})$ introduit par la mesure précédente. En effet, si nous connaissions exactement le biais, il serait possible de travailler, non pas sur les mesures $X_i$, mais sur les valeurs redressées $Z_i$ telles que :

$$Z_i = X_i - B(\mu_{pi}) = \mu + \varepsilon_i$$

et l'espérance

$$E(e.t)_z^2 = \sigma^2$$

avec

$$(e.t)_z^2 = \frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^{k} (Z_i - \bar{Z})^2$$

La précision de nos mesures pourrait être donnée par $(e.t)^2$.

En fait, on ne connaît pas exactement le biais. Il est possible cependant de l'estimer et l'on aura alors la relation :

$$\hat{B}(\mu_{pi}) = B(\mu_{pi}) + e_i$$

où l'on suppose que les erreurs $e_i$ sur les biais sont indépendantes et ont même variance $\sigma_e^2$. Les mêmes $X_i$ peuvent être redressés du biais et l'on peut alors travailler sur :

$$Y_i = X_i - \hat{B}(\mu_{pi})$$

La précision peut être estimée par l'écart quadratique moyen des $Y_i$ qui a une espérance

$$E(Y_i - \mu)^2 = \sigma^2 + \sigma_e^2$$

Elle sera moins bonne que celle que l'on aurait si on connaissait exactement le biais, puisque, à $\sigma$ s'ajoute l'erreur $\sigma_e$ due à l'estimation du biais. On peut penser cependant que si ce dernier n'est pas trop mal estimé, $\sigma_e^2$ sera petit devant $\frac{1}{k}\sum_{i=1}^{k} B^2(\mu_{pli})$. Dans ces conditions, un gain de précision pourra être obtenu en travaillant sur les mesures $Y_i$ plutôt que sur les mesures $X_i$.

### 2. — *Détermination du biais introduit par la mesure précédente*

Afin de déterminer la valeur du biais introduit sur une mesure par l'échantillon immédiatement précédent, on répète 5 fois la séquence suivante, qui permet de mesurer chaque solution précédée d'un échantillon de concentration différente :

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 10 | 10 | 20 | 10 | 30 | 10 | 40 | 10 | 50 | 10 | 60 | 10 | 0 |
| | 0 | 20 | 20 | 30 | 20 | 40 | 20 | 50 | 20 | 60 | 20 | 0 | |
| | | 0 | 30 | 30 | 40 | 30 | 50 | 30 | 60 | 30 | 0 | | |
| | | | 0 | 40 | 40 | 50 | 40 | 60 | 40 | 0 | | | |
| | | | | 0 | 50 | 50 | 60 | 50 | 0 | | | | |
| | | | | | 0 | 60 | 60 | 0 | | | | | |

Le modèle retenu pour estimer le biais est le suivant :

$$(X_i - \mu_l) = a_o + a_1(\mu_l - \mu_{pli}) + \varepsilon_i$$

ou : $\mu_l$ est la vraie valeur de la dose mesurée

$X_i$ est la mesure de la dose $\mu_l$ après passage de la dose $\mu_{pli}$

$\mu_{pli}$ est la valeur de la mesure précédente

$a_o$ et $a_1$ sont des coefficients estimés à partir des observations.

On a trouvé

$$\boxed{(X_i - \mu_l) = -0{,}0223 - 0{,}0365\ (\mu_l - \mu_{pli}) + \varepsilon_i} \qquad (3)$$

et on obtient la droite de la figure 2 avec comme table d'analyse de variance :

| Source de variation | Somme des carrés | Degré de liberté | F calculé | Var. | e.t. |
|---|---|---|---|---|---|
| Constante . . . . . | 8,80 | 1 | 28,42 | — | — |
| Coefficient de régression . . . . . | 192,23 | 1 | 820,48 | — | — |
| Résiduelle . . . . . | 64,44 | 208 | — | 0,31 | 0,56 |

L'estimation du biais obtenue à partir de la courbe calculée (fig. 2) n'est pas parfaite. De nombreux points expérimentaux s'écartent assez largement de la droite. On observe une dissymétrie dans la courbe d'estimation du biais pour les valeurs $\mu_l - \mu_{pli} < 0$ ou $\mu_l - \mu_{pli} > 0$. Une amélioration pourrait être obtenue (et a été testée) en faisant l'estimation avec les données $\mu_l - \mu_{pli} > 0$ d'une part et $\mu_l - \mu_{pli} < 0$ d'autre part. Cependant le nombre de nos données expérimentales, dans chacun des domaines positif et négatif, est deux fois plus faible, et la précision, avec laquelle sont connues les estimations du biais, est moins bonne que lorsqu'on considère l'ensemble des données. En définitive, on perd en précision ce que l'on a gagné en améliorant le modèle.

En pratique, l'expérimentateur ne connaît pas $\mu_l$. Il ne connaît que les valeurs expérimentales des $X_i$ et $\mu_{pli}$. Il peut donc estimer le biais de ses mesures $(X_i - \mu_l)$ en fonction de la différence $(X_i - \mu_{pli})$. Cette estimation se déduit de celle réalisée sur les solutions étalons connues.

En effet,

$$X_i - \mu_l - a_1\mu_l = a_o - a_1\mu_{pli} + \varepsilon_i$$

$$\mu_l = \frac{a_1}{1 + a_1}\,\mu_{pli} - \frac{a_o}{1 + a_1} - \frac{\varepsilon_i}{1 + a_1} + \frac{X_i}{1 + a_1}$$

d'où

$$(X_i - \mu_l) = \frac{a_o}{1 + a_1} + \frac{a_1}{1 + a_1}\,(X_i - \mu_{pli}) + \frac{\varepsilon_i}{1 + a_1}$$

Le biais estimé noté

$$\widehat{\text{Biais}} = \frac{a_o}{1 + a_1} + \frac{a_1}{1 + a_1}\,(X_i - \mu_{pli})$$

est alors entaché d'une erreur $\dfrac{\varepsilon_i}{1 + a_1}$.

Malgré son imperfection, l'application de l'estimation du biais a été effectuée sur les mesures $X_i$ de l'essai (A). Celles-ci, corrigées du biais à l'aide de l'équation (3), sont notées $Y_i$ et nous avons calculé d'une part l'écart-type des mesures de chaque série, soit :

$$(\text{e.t})_Y^2 = \frac{1}{k - 1} \sum_{i=1}^{k} (Y_i - \overline{Y})^2$$

et d'autre part l'écart quadratique moyen, en tenant compte de l'incertitude liée à la détermination du biais, soit :

$$(\text{e.q.m})_Y^2 = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^{k} (Y_i - \mu)^2$$

$\mu$ étant la concentration réelle de la solution.

La correction du biais paraît amener un gain de précision appréciable (tabl. 5) et en tous cas stabiliser cette précision pour l'ensemble du domaine de mesure. Nous pouvons cependant remarquer qu'en raison d'une estimation insuffisamment précise du biais, l'écart entre l'estimation de l'erreur par l'écart quadratique moyen $(\text{e.q.m})_Y$ et l'écart-type $(\text{e.t.})_Y$ reste important.

TABLEAU 5

*Correction du biais dû à la pollution d'un échantillon sur le suivant lors du dosage automatisé de l'acide galacturonique*
*Estimation de la précision des résultats pour des échantillons distribués au hasard (essai A) après avoir effectué la correction due au biais*
$(e.t)_y$ = écart-type des mesures
$(e.q.m)_y$ = écart quadratique moyen des mesures

| Échantillon (µg/ml) | Résultats de la mesure avec | | | |
|---|---|---|---|---|
| | calcul de l'écart-type estimé des $Y^i$ | | calcul de l'écart quadratique moyen des $Y^i$ | |
| | $(e.t)_y$ | $P_1$ (%) | $(e.q.m)_y$ | $P_1$ (%) |
| 10 | 0,379 | 8 | 0,908 | 18,6 |
| 20 | 0,382 | 4 | 0,616 | 6,3 |
| 30 | 0,376 | 2,6 | 0,450 | 3 |
| 40 | 0,631 | 3,2 | 0,624 | 3 |
| 50 | 0,578 | 2,9 | 0,716 | 2,9 |
| 60 | 0,662 | 2,2 | 0,704 | 2,4 |

TABLEAU 6

*Correction du biais dû à la pollution d'un échantillon sur le suivant lors du dosage automatisé de l'acide galacturonique*
*Estimation de la précision des résultats pour des échantillons distribués au hasard à l'intérieur de 2 séries de concentrations voisines (essai B) après avoir effectué la correction due au biais*
$(e.t)_y$ = écart-type des mesures
$(e.q.m)_y$ = écart quadratique moyen des mesures

| Échantillon (µg/ml) | Résultats de la mesure avec | | | |
|---|---|---|---|---|
| | calcul de l'écart-type estimé des $Y^i$ | | calcul de l'écart quadratique moyen des $Y^i$ | |
| | $(e.t)_y$ | $P^1$ (%) | $(e.q.m)_y$ | $P_1$ (%) |
| 10 | 0,184 | 3,8 | 0,233 | 4,7 |
| 20 | 0,164 | 1,7 | 0,635 | 6,5 |
| 30 | 0,211 | 1,4 | 0,809 | 5,5 |
| 40 | 0,220 | 1,1 | 0,228 | 1,7 |
| 50 | 0,189 | 0,7 | 0,618 | 2,5 |
| 60 | 0,620 | 2 | 0,645 | 2,2 |

Par ailleurs, les résultats de l'essai (B) sont également dans l'ensemble améliorés lorsque l'on corrige les mesures, du biais estimé (tabl. 6), mais moins que pour l'essai (A). Ceci est normal : en effet, la gamme des concentrations de l'essai (B) est plus réduite. La taille du biais introduit par la mesure précédente est faible, l'erreur d'estimation du biais devient importante devant le biais lui-même. La correction introduite est donc moins bonne que dans le cas de l'essai (A).

### 3. — *Évaluation pratique du biais*

Nous venons de voir que lors de l'utilisation de certaines méthodes de dosages automatisées, les résultats obtenus sont parfois biaisés par suite sans doute de la pollution due à, et fonction de, l'échantillon immédiatement précédent. Il est possible, pour des conditions opératoires données, de déterminer, au moyen d'une expérience simple, une abaque qui permettra de corriger les résultats bruts d'analyses d'échantillons disposés dans un ordre aléatoire.

Pour ce, dans la pratique, on répètera un certain nombre de fois (5 au minimum) la séquence des échantillons de concentrations connues donnée au paragraphe précédent. Par référence à la valeur vraie de chaque échantillon, on calcule la différence de chacun des échantillons analysés (qui est le biais) et on la porte sur un graphique en fonction de la différence entre la concentration de cet échan-

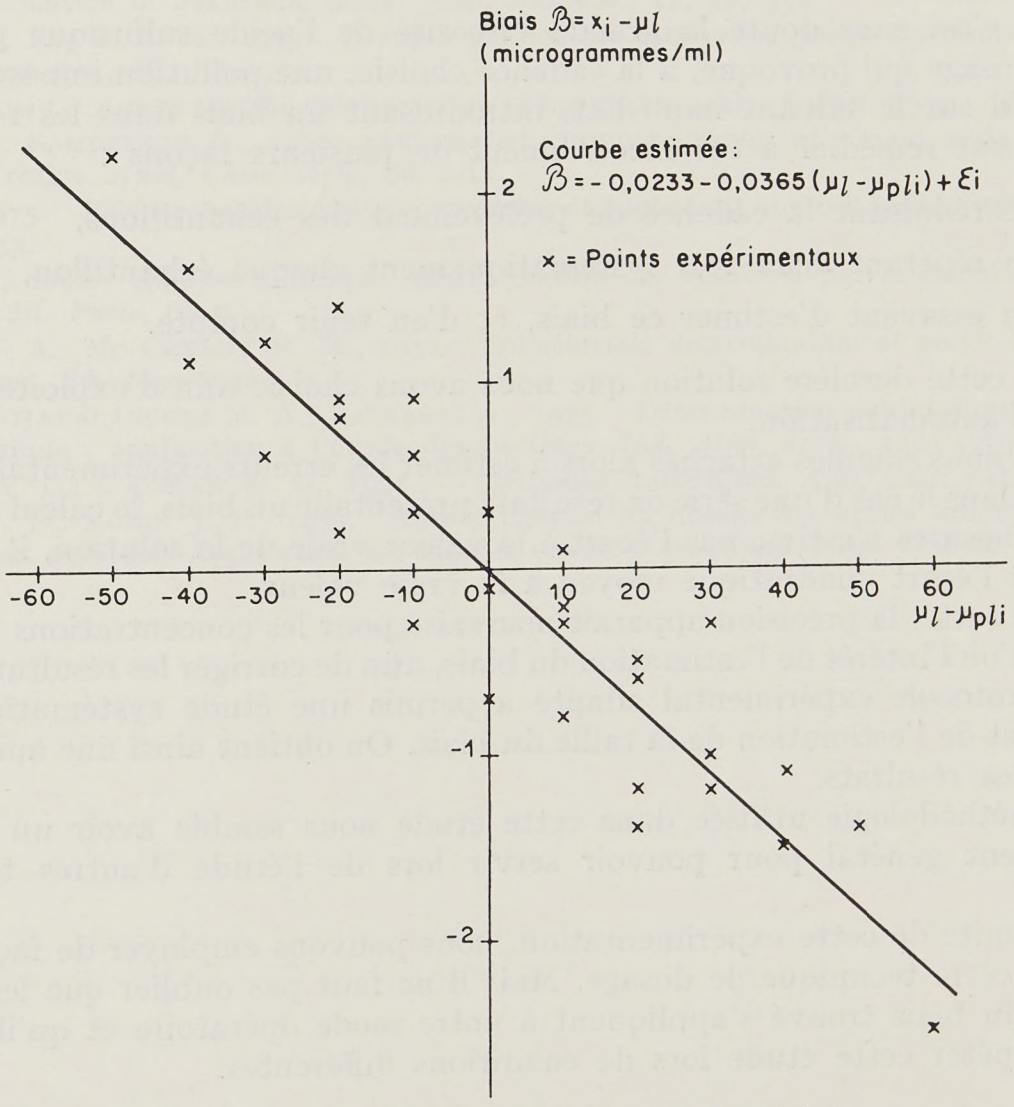



FIG. 2. — *Estimation expérimentale du biais.*

tillon et celle de l'échantillon qui l'a précédé. On obtient ainsi un nuage de points (fig. 2) qui permet de tracer la droite estimée du biais à laquelle on se réfèrera pour corriger les résultats bruts des analyses.

On voit par exemple que pour une différence de concentration de 40 µg/ml, c'est-à-dire à un échantillon d'environ 50 µg/ml passant après un de 10, il faut ajouter, à la valeur trouvée, 1,5 µg/ml. Si la différence est de moins 40 µg (un échantillon de 20 µg passant après un de 60), il faut au contraire, à la valeur trouvée, retrancher 1,45 µg.

Il est bien évident que l'abaque ainsi tracée est fonction des conditions opératoires et que toute modification importante de celles-ci (canalisations utilisées, vitesse de la pompe...) doit amener l'expérimentateur à la refaire.

## Conclusion

Le dosage automatisé sur analyseur à flux continu, de l'acide galacturonique après séparation des différentes fractions pectiques, présente des avantages indéniables de rapidité et de confort de manipulation. Cependant, devant l'inadéquation, à nos besoins expérimentaux, des méthodes automatisées existantes, nous avons mis au point un montage et un mode opératoires donnant les mêmes avantages de sensibilité que la méthode manuelle, tout en permettant de doser 20 échantillons à l'heure.

Mais c'est sans doute la grande viscosité de l'acide sulfurique pur utilisé dans ce dosage qui provoque, à la cadence choisie, une pollution importante d'un échantillon sur le suivant immédiat, introduisant un biais dans les résultats.

On peut remédier à cet inconvénient de plusieurs façons :

— en réduisant la cadence de prélèvement des échantillons,

— en répétant deux fois systématiquement chaque échantillon,

— en essayant d'estimer ce biais, et d'en tenir compte.

C'est cette dernière solution que nous avons choisie afin d'exploiter l'intérêt total de l'automatisation.

Nous nous sommes attachés alors à estimer les erreurs expérimentales et à les corriger. Dans le cas d'une série de résultats présentant un biais, le calcul de l'écart-type des mesures n'estime pas l'écart à la valeur vraie de la solution, il faut alors considérer l'écart quadratique moyen à la vraie valeur.

De la sorte, la précision apparaît mauvaise pour les concentrations fortement biaisées, d'où l'intérêt de l'estimation du biais, afin de corriger les résultats. A cette fin, un protocole expérimental adapté a permis une étude systématique de la pollution et de l'estimation de la taille du biais. On obtient ainsi une amélioration sensible des résultats.

La méthodologie utilisée dans cette étude nous semble avoir un caractère suffisamment général pour pouvoir servir lors de l'étude d'autres techniques biaisées.

A la suite de cette expérimentation, nous pouvons employer de façon mieux raisonnée cette technique de dosage. Mais il ne faut pas oublier que les caractéristiques du biais trouvé s'appliquent à notre mode opératoire et qu'il y aurait lieu de répéter cette étude lors de conditions différentes.

*Reçu pour publication en décembre 1979.*

## Summary

*Study and use of an automated colorimetric method which gives systematic errors*
*Application to the galacturonic acid determination*

The automated colorimetric determination of Galacturonic acid by the Carbazol method is improved by modifications of manifold and reagent concentration.

To have analyse of a sufficient number of samples per hour (20 is a minimum), sulfuric acid viscosity causes systematic errors in the results. These errors are in excess when the preceding sample is high in concentration, and on the contrary in default when the preceding sample is low. In this case it is unsignificant and dangerous to use the standard deviation, $(e.t)_x$, which considers the difference with the true value of sample and not with the mean value; but the precision is very bad when the difference in concentration of two successive samples is important.

This work shows how it is possible to estimate this systematic error to improve results.


## Références bibliographiques


Balazs E. A., Berntsen K. O., Karosa J., Swann D. A., 1965. — An automated method for the determination of hexuronic acids. *Anal. Biochem.*, **12**, 547-558.

Dietz J. H., Rouse A. H., 1953. A rapid method for estimating pectic substances in citrus juices. *Food Res*,, **18**, 169-177.

Dische Z., 1947. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.*, **167**, 189-198.

Johnson S., Samuelson O., 1966. Automated chromatography of uronic acids on anion-exchange resins. *Anal. Chim. Acta*, **36**, 1-11.

Knee M., 1973. Polysaccharides and glycoproteins of apple fruit and cell walls. *Phytochemistry*, **12**, 637-653.

Lacroix Y., 1962. Analyse chimique. Interprétation des résultats par le calcul statistique. *Masson Edit. Paris*, 68 p.

Mc Comb E. A., Mc Cready R. M., 1952. Colorimetric determination of pectic substances. *Anal. Chem.*, **24**, 1630-1632.

Sarris J., Vijayalakshmi M. A., Latrasse A., 1975. Détermination automatique de l'acide galacturonique : application à l'étude des pectines. *Ind. Alim. agric.*, 1265-1269.

Snedecor W. G., Cochran W. G., 1971. — Méthodes statistiques. *Acta, Edit.* Paris.

Thibault J. F., Robin J. P., 1975. Automatisation du dosage des acides uroniques par la méthode au carbazol. Application au cas des matières pectiques. *Ann. Technol. agric.*, **24**, 99-110.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (4), 387-395.

# Utilisation de micro-ondes pour le blanchiment de lanières de céleri

P. VAROQUAUX(*), F. SAUVAGEOT (**), M. CHAPON(**) et P. DUPUY(*)

(*) *Département de Technologie des Produits Végétaux, I.N.R.A., 17, rue Sully, B.V. 1540, 21034 Dijon Cedex*

(**) *E.N.S.B.A.N.A., ECP. Campus Universitaire, 21000 Dijon*

## Résumé

Du céleri en lanières destiné à la conservation en saumure acide a été blanchi aux micro-ondes (500 W-CW) à 915 MHz, pendant 90, 100, 110, 120 et 130 s, dans des bocaux de verre. Le rendement après 8 mois de conservation montre un gain pondéral maximal de 8 p. 100 par rapport au Témoin fabrication usine ayant subi une pasteurisation. L'analyse sensorielle révèle une amélioration sensible de la texture et de la couleur des échantillons blanchis aux micro-ondes. Les résultats concernant l'arôme et la flaveur sont légèrement en défaveur du procédé proposé. Le produit reste cependant acceptable après le traitement.

Mots clés : *micro-ondes, blanchiment, céleri*

## Introduction

Le blanchiment aux micro-ondes des fruits et légumes a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Les résultats obtenus ne sont pas systématiquement en faveur de ce mode de chauffage (Eheart et Gott, 1964; Maga et Twomey, 1977). Ainsi l'usage des micro-ondes est peu adapté au blanchiment des légumes verts (Dietrich, Huxsoll et Guadagni, 1970; Varoquaux et Avisse, 1972). Cependant, les micro-ondes se prêtent bien au chauffage des fruits et légumes de grande taille (Chen *et al.*, 1971; Avisse, Varoquaux et Sarris, 1974) ou découpés. Nous avons utilisé la fréquence de 915 MHz pour blanchir et pasteuriser des lanières de céleri destinées à la conservation en saumure acide. Les qualités organoleptiques ainsi que le rendement pondéral et la texture des échantillons blanchis aux micro-ondes ont été comparés à ceux d'un témoin pasteurisé dans les conditions de l'industrie.

## Matériel et méthodes

### *Préparation des échantillons*

Des céleris entiers et frais ont été pelés manuellement et conservés momentanément dans une solution d'acide citrique à 0,2 p. 100. Les céleris parés ont été découpés mécaniquement en lanières de section (1,5 × 1,5 mm). Environ 200 g de lanières (pesées au g près) sont introduites dans des bocaux de verre de 0,37 l (verrerie Champenois VMC. 1226). Les échantillons sont ensuite traités dans les conditions suivantes.

Les essais de blanchiment aux micro-ondes ont été effectués dans un guide rectangulaire standard à 915 MHz. L'axe des bocaux se trouve parallèle aux petits côtés verticaux du guide et placé dans le plan médian de ce dernier. Les pots sont, en outre, posés sur un plateau tournant entraîné par un moteur se trouvant à l'extérieur du guide. A la partie supérieure de celui-ci est pratiquée une ouverture circulaire pour l'introduction des pots. Cette ouverture est fermée par un bouchon fileté avant mise en marche du générateur. La cavité elle-même est excitée par un guide standard équipé d'un appareil automatique de mesure du taux d'onde stationnaire. Ce dispositif est alimenté, à travers une transition guide-coaxial, par un générateur à 915 MHz d'une puissance de 500 W continu. Du côté « sortie », la cavité est fermée sur un piston de court-circuit variable.

Les échantillons retenus pour cette étude, ont subi des durées d'exposition comprises entre 90 et 130 secondes. Ces temps d'exposition provoquent une élévation de température dans les pots, nécessaire pour assurer l'inactivation des enzymes (peroxydase et polyphénoloxydase) requise pour la conservation des produits. Les températures finales des lanières blanchies sont présentées sur le tableau 1.

TABLEAU 1

*Températures initiales et finales des échantillons exposés aux micro-ondes (moyennes de 3 mesures)*

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Température initiale (°C) . . . . . | 18,9 | 18,9 | 19,2 | 16,3 | 19,0 | 17,7 |
| Temps d'exposition (secondes) . . . | 60 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 |
| Température finale (°C) . . . . . | 70 | 88,3 | 91,2 | 92,5 | 93 | 94,1 |

Après ce traitement aux micro-ondes (90, 100, 110, 120 et 130 s), les bocaux (20 unités par temps de blanchiment) ont été jutés à chaud (90-95 °C) avec la solution suivante :

- NaCl . . . . . 3,25 %
- Acide citrique . . . . . 0,25 %
- Acide ascorbique . . . . . 0,04 %
- Acide acétique . . . . . 2,25 %

Les bocaux jutés ont été ensuite capsulés sous jet de vapeur et mis à refroidir immédiatement dans l'eau froide (15 °C).

Les échantillons témoins traités suivant la pratique industrielle ne sont pas blanchis au préalable. L'inactivation des enzymes se produit pendant la pasteurisation. Quarante bocaux témoins ont été jutés à chaud (90-95 °C), capsulés sous jet de vapeur et placés 20 min dans un bain thermostaté à 85 °C. Après cette pasteurisation classique, les bocaux sont refroidis par immersion dans deux bacs, le premier à 40 °C environ et le second à 15 °C.

Tous les bocaux sont ensuite conservés 8 mois à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Deux bocaux de chaque série ont été placés dans une étuve à 30 °C. Au bout d'un mois aucune altération de nature microbiologique n'a été décelée.

## Méthodes expérimentales

*Les mesures physico-chimiques.*

a) *Rendement pondéral*

Deux bocaux de chaque série ont été ouverts et mis à égoutter pendant 5 min sur un tamis en inox présentant une ouverture de maille de 2,5 mm aux normes AFNOR.

*b*) La texture a été évaluée à l'aide d'une cellule Christel contenant 50 g de lanières égouttées. On a utilisé une machine d'essais INSTRON modèle TMSLS dans les conditions suivantes :

- Vitesse de la traverse mobile = 5 cm /min
- Échelle de sensibilité = 100 kg

L'indice tendérométrique est la force nécessaire pour provoquer la rupture des lanières de céleri contenues dans l'éprouvette par les dents de la broche fixée sur la traverse mobile. L'indice tendérométrique est directement exprimé en kg (force s'exerçant sur la jauge de mesure).

*c*) L'évaluation sensorielle est réalisée par un groupe de 80 sujets. L'épreuve élémentaire est une épreuve de classement des 6 échantillons sur une échelle non structurée (tabl. 2). Le classement porte sur une caractéristique précisée parmi une

TABLEAU 2

*Le questionnaire : un exemple pour la qualité du parfum*

Six échantillons de céleri vous sont proposés codés :

77 - 54 - 30 - 27 - 19 et 89

Vous les placez dans l'ordre (de gauche à droite)

54 - 19 - 89 - 70 - 27 - 77

Et vous appréciez par flairage la qualité de leur parfum céleri. Vous portez votre réponse au moyen d'un trait placé sur l'échelle ci-dessous et surmonté du code de l'échantillon. Les ex-aequo ne sont pas permis.

| Parfum très caractéristique | Parfum peu caractéristique |
|---|---|

TABLEAU 3

*Répartition des caractéristiques évaluées par sous-groupe*

| | |
|---|---|
| Sous-groupe A | Épreuve 1 - Caractère croquant<br>Épreuve 2 - Qualité du parfum |
| Sous-groupe B | Épreuve 1 - Intensité de l'arôme<br>Épreuve 2 - Couleur : de laiteuse à jaune |
| Sous-groupe C | Épreuve 1 - Acceptabilité générale<br>Épreuve 2 - Intensité du parfum |
| Sous-groupe D | Épreuve 1 - Qualité de l'arôme<br>Épreuve 2 - Couleur : d'uniforme à marbrée |

liste de huit caractéristiques possibles. Afin d'éviter un éventuel effet d'entraînement d'une caractéristique sur une autre, le groupe de 80 sujets est divisé par tirage aléatoire en 4 sous-groupes de 20 sujets, chaque sous-groupe réalisant deux épreuves élémentaires sur des séries différentes comme indiqué sur le tableau 3. De plus, dans chaque sous-groupe, la moitié des sujets évalue d'abord les échantillons de l'épreuve 1, puis ceux de l'épreuve 2; l'autre moitié opère de manière inverse. Enfin, à l'intérieur de chaque épreuve, l'ordre de présentation des échantillons varie selon le sujet.

Les deux épreuves sont réalisées successivement au cours de la même séance, un repos de quelques minutes est cependant imposé à chaque sujet. Par ailleurs, du pain et de l'eau sont à la libre disposition du sujet pour favoriser l'élimination des flaveurs portées par les échantillons évalués précédemment. Chaque échantillon provient du mélange du contenu de 10 bocaux, le céleri ayant été au préalable égoutté sur une passoire, immergé dans de l'eau froide (pour éliminer la « gelée » apparue autour de certaines lanières, notamment de celles qui correspondent aux durées de blanchiment les plus élevées).

Les échantillons sont servis à température ambiante, soit sur des soucoupes blanches pour les épreuves de couleur et d'acceptabilité générale, soit dans des flacons en verre de 100 ml de volume recouverts d'un verre de montre pour les épreuves portant sur le parfum ou de papier d'aluminium pour les épreuves portant sur l'arôme et la texture. L'interprétation statistique est réalisée au moyen de la technique de KRAMER *et al.*, (1974) qui permet, au moyen de la somme des rangs de chaque échantillon de déterminer si les différences entre échantillons sont significatives. Dans l'affirmative, les rangs indiqués par chaque sujet sont alors transformés en notes selon la technique de FISCHER et YATES (1942).

L'échantillon de rang 1 obtient la note + 1,27
L'échantillon de rang 2 obtient la note + 0,64
L'échantillon de rang 3 obtient la note + 0,20
L'échantillon de rang 4 obtient la note — 0,20
L'échantillon de rang 5 obtient la note — 0,64
L'échantillon de rang 6 obtient la note — 1,27

Ces notes sont justiciables de l'analyse de la variance et donc de la technique de la plus petite différence significative qui permet une approche simple des différences entre échantillons (SNEDECOR et COCHRAN, 1975).

## Résultats

### *Le bilan pondéral*

Le poids net égoutté augmente sensiblement lorsque le temps de blanchiment s'allonge avec un maximum qui se situe vers 120 s (tableau 4).

TABLEAU 4

*Rendement des lanières de céleri traitées aux micro-ondes après 8 mois de conservation*

| Échantillons | Poids net égoutté (grammes) | Rendement % poids mis en œuvre |
|---|---|---|
| T | 147 | 73,5 |
| 90 | 148 | 74 |
| 100 | 150 | 75 |
| 110 | 160 | 74 |
| 120 | 162 | 81 |
| 130 | 158 | 79 |

Le blanchiment aux micro-ondes augmente le poids net égoutté d'environ 15 g au maximum par rapport au témoin. Ce poids correspond à une économie potentielle de l'ordre de 8 p. 100 du poids de céleri mis en œuvre. Nous avons déjà mis en évidence l'effet très positif du blanchiment aux micro-ondes (à 2 450 MHz) sur le rendement des pêches destinées à la surgélation (AVISSE, VAROQUAUX et DUPUY, 1974). L'amélioration de la rétention d'eau est vraisemblablement imputable à l'hydrolyse partielle des protopectines contenues dans les céleris. Cette nette augmentation du rendement s'accompagne cependant de la formation d'une gelée enrobant les lanières.

### *La texture*

Les différences sont significatives entre échantillons (tabl. 5). L'échantillon le plus croquant est l'échantillon 120 et le moins croquant le témoin. L'indice tendérométrique confirme partiellement cette donnée : l'échantillon présentant la valeur la plus basse est le Témoin mais les échantillons 120-100 obtiennent pratiquement le même indice, à la différence de ce qui est observé par voie sensorielle.

TABLEAU 5

*Sommes des rangs obtenues par l'analyse sensorielle des 5 échantillons traités aux micro-ondes et du témoin*

| Caractéristiques | Témoin | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | Signification de rangs 1 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Couleur d'uniforme à marbrée | 110 | 71 | 80 | 21 | 49 | 89 | uniforme | marbrée |
| Couleur de laiteuse à jaune | 114 | 77,5 (2) | 84,5 | 23 | 51 | 70 | laiteuse | jaune |
| Parfum intensité | 57 | 67,5 | 68 | 86 | 56 | 85,5 | fort | faible |
| Parfum qualité (1) | 49 | 67,5 | 70,5 | 90,5 | 68 | 56,5 | + caractéristique | — |
| Arôme intensité | 55 | 80 | 68 | 82 | 72 | 63 | fort | faible |
| Arôme qualité | 68 | 72 | 62 | 79 | 66 | 73 | + caractéristique | — |
| Caractère croquant | 86 | 71 | 73,5 | 64 | 51 | 74,5 | + croquant | — |
| Acceptabilité générale | 65 | 87 | 67,5 | 79,5 | 62 | 59 | + acceptable | — |

(1) Sur 19 réponses.
(2) Bien que non autorisées, certaines réponses ex-aequo ont été observées.
Des différences significatives sont observées lorsque les valeurs sont inférieures ou supérieures à :

| | Seuil 5 % | Seuil 1 % |
|---|---|---|
| 19 réponses | 49-84 | 45-88 |
| 20 réponses | 52-88 | 48-92 |

| | 120 | 110 | 90 | 100 | 130 | Témoin |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Note moyenne (après transformation des rangs) | 0,49 | 0,14 | — 0,03 | — 0,08 | — 0,12 | — 0,39 |
| Indice tendérométrique | 62 | — | 64 | 64 | 25 | 20 |

Deux échantillons soulignés par un trait continu sont non significativement différents au seuil 5 p. 100.

*Le parfum et l'arôme*

Alors que pour le parfum (complexe olfactif perçu par flairage) les différences entre échantillons sont significatives (tabl. 5); elles ne le sont pas pour l'arôme (complexe olfactif perçu par voie rétro-nasale). Le témoin présente à la fois le parfum de céleri le plus caractéristique et le plus intense, l'inverse étant observé par l'échantillon 110.

| | Témoin | 120 | 90 | 100 | 130 | 110 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Intensité du parfum (note moyenne) . . | 0,34 | 0,33 | 0,06 | 0,02 | — 0,36 | — 0,39 |

| | Témoin | 130 | 90 | 120 | 100 | 110 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Qualité du parfum . . . . . | 0,44 | 0,34 | — 0,01 | — 0,03 | — 0,07 | — 0,64 |

*La couleur*

C'est à ce niveau que les différences entre échantillons sont les plus élevées : le témoin apparaît très différent des autres échantillons; il est plus jaune et plus marbré. Trois groupes semblent se dessiner parmi les échantillons traités aux micro-ondes. L'échantillon 110 est le moins marbré et le plus blanc.

| | 110 | 120 | 90 | 100 | 130 | Témoin |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Coloration uniforme → marbrée . . . . . | 1,24 | 0,44 | — 0,02 | — 0,24 | — 0,43 | — 0,99 |

| | 110 | 120 | 130 | 90 | 100 | Témoin |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Coloration laiteuse → jaune. . . . . | 1,19 | 0,41 | 0,00 | — 0,19 | — 0,31 | — 1,10 |

*Acceptabilité générale*

Fondamentalement cette épreuve d'acceptabilité est une preuve hédonique : les sujets répondent en fonction de leur seule préférence. Les différences ne sont pas significatives sur la somme des rangs (tabl. 5), mais elles le deviennent (au seuil 5 p. 100) après transformation des rangs en notes; toutefois les seules différences significatives sont observées entre les échantillons 130 et 90, les échantillons 130 et 110 et les échantillons 120 et 90 (l'échantillon 90 étant « rejeté »).

| 130 | 120 | Témoin | 100 | 110 | 90 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,29 | 0,18 | 0,13 | — 0,08 | — 0,23 | — 0,43 |

## Discussion

Du point de vue de leur incidence sur les caractéristiques sensorielles, les micro-ondes présentent des avantages et des inconvénients.

La couleur est plus blanche et moins marbrée, la texture est plus croquante. Cette double observation s'explique très probablement par l'absence de surcuisson du produit, inévitable dans le procédé industriel qui exige une pasteurisation de longue durée.

Une gelée apparaît autour des lanières due à une hydrolyse partielle des protopectines et, surtout, les échantillons manquent de parfum. Le jugement global sur l'acceptabilité n'est pas net; l'échantillon témoin est placé en milieu de gamme, très voisin des autres échantillons. Il convient d'ailleurs de souligner que les résultats de l'épreuve d'acceptabilité semblent difficiles à interpréter à la lumière des caractéristiques non hédoniques. En effet, si l'on prend comme indice de « distance » la valeur absolue de la différence entre les deux échantillons que l'on compare et que l'on somme les valeurs obtenues pour chaque caractéristique non hédonique, on s'aperçoit que les échantillons 130 et 90 (classés 1 et 6 du point de

vue hédonique) sont beaucoup plus proches du point de vue analyse que ne le sont les échantillons 130 et 120 (classés 1 et 2) ou 110 et 130 (classés 5 et 6). L'acceptabilité n'est pas une combinaison simple de données qualitatives-quantitatives : cette observation quotidienne pour maintes denrées alimentaires est ainsi vérifiée dans le cas du céleri.

Le blanchiment et la pasteurisation des lanières de céleri destinées à être conservées en saumure acide présente par rapport au traitement classique un avantage de rendement. Le procédé proposé entraîne une amélioration du poids net égoutté très sensible par rapport au témoin. L'augmentation peut atteindre environ 8 p. 100 du poids de céleri mis en œuvre (200 g de lanières, exposition 120 s, puissance émise 500 W à 915 MHz).

### *Application industrielle*

Le blanchiment aux micro-ondes des lanières de céleri dans des bocaux de verre permettrait les simplifications suivantes.

*a*) La chaîne de fabrication serait beaucoup plus courte, puisque des installations très volumineuses comme le pasteurisateur continu et le bain de prérefroidissement sont supprimées. En effet, d'une part le jutage à chaud des lanières préalablement blanchies est largement suffisant, pour assurer une parfaite stabilité microbiologique et d'autre part le traitement aux micro-ondes n'élève pratiquement pas la température des récipients. Les bocaux jutés à chaud peuvent être immédiatement refroidis dans l'eau froide (15-20 °C) ce qui est absolument impossible dans le procédé classique.

*b*) Le gain de temps est considérable puisque la durée de fabrication passe d'environ 30 min dans la technique classique à moins de 10 min dans le procédé proposé.

*c*) Le blanchiment aux micro-ondes est polyvalent. Il peut également être utilisé, sans grandes modifications, pour le traitement des carottes en lanières, des olives, des oignons blancs, des cornichons, des choux-rouges, des betteraves, etc...).

L'application de ce procédé se heurte cependant à une difficulté technique, le strict contrôle de l'énergie reçue par le produit. En effet, pour des temps d'exposition inférieurs à un optimum (110 s environ dans nos conditions expérimentales, on observe une amélioration de pratiquement toutes les caractéristiques techniques et organoleptiques du produit traité. Au delà, les micro-ondes provoquent très rapidement leur altération. Il est d'autre part indispensable de fixer pour chaque type de produit et de conditionnement la meilleure durée d'exposition correspondant à une énergie optimale.

*Reçu pour publication en décembre 1979.*

## Summary

### *Microwave blanching of strips of celery tissue*

Strips of celery tissue were dry-heated in a microwave oven (500 W-CW, 915 MHz) from 90 to 130 seconds. These tissues were compared to tissue strips blanched according to standard processor practice. Microwave blanching resulted in a slightly increased yield (8 p. 100 maximum)

based on drained tissue weight. Mean sensory scores for color and texture were significantly higher for microwave treated celery. Both methods yielded celery with acceptable flavor and taste, with a slight favoring of the conventionally treated celery.

## Références bibliographiques

AVISSE Cl., VAROQUAUX P., DUPUY P., 1974. Utilisation des micro-ondes pour le blanchiment des pêches. *Acad. Agric.*, **60**, 741-749.

CHEN S. C., COLLINS J. L., MC CARTY I. E., JOHNSTON M. R., 1971. Blanching of white potatoes by microwave energy followed bv boiling water. *J. Food Sci.*, **36**, 742-743.

DIETRICH W. C., HUXSOLL C. C., GUADAGNI D. G., 1970. Comparison of microwave, conventional and combination blanching of Brussels sprouts for frozen storage. *Food Technology*, **24**, 613-617.

EHEART M. S., GOTT C., 1964. Conventional and microwave cooking of vegetables ascorbic acid and carotenc retention and palatability. *J. Amer. Diet. Assn.*, **44**, 116-119.

FISCHER R. A., YATES F., 1942. Statistical tables. *Oliver and Boyd Ltd.* Edimbourg. Table XX

KRAMER A., KAHAN G., COOPER, D., PAPAVASILIOU A., 1974. A non parametric ranking method for the statistical evaluation on sensory data. *Chemical Sens. and Flavor*, **1**, 121-133.

MAGA J. A., TWOMEY J. A., 1977. Sensory comparison of four potato varieties baked conventionnally and by microwaves. *J. Food Sci.*, **42** (2), 541-542.

SNEDECOR G. W., COCHRAN W. G., 1957. Méthodes statistiques. Trad. BOELE H. et CAMAWAGI, 1971, *Acta*, Paris.

VAROQUAUX P., AVISSE Cl., 1972. Le blanchiment des pois par l'eau et par les micro-ondes. *6e Congrès International de la Conserve*, Paris, 267-273.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (4), 397-422.

# Mise au point d'indices rhéologiques de texture en relations avec quelques caractères biochimiques chez la carotte (*Daucus carota* L.)

S. AUBERT (*), A. BONNET (**), B. SZOT (***)

avec la collaboration technique de G. JACQUEMIN (*) et M. IMPERIALI (**)

(*) *Station de Technologie des Produits Végétaux, I.N.R.A.,*
(**) *Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères, I.N.R.A., Centre de Recherche d'Avignon, 84140 Montfavet*
(***) *Institut Agrophysique de Lublin*
*Académie des Sciences de Pologne*
*(Pologne)*

---

## Résumé

Dans le but de mettre à la disposition des sélectionneurs des critères de qualité, objectifs et simples, sur la texture des carottes, des corrélations ont été recherchées entre divers indices de résistance mécanique des racines et quelques caractères biochimiques (acidités, fibres, matières insolubles dans l'alcool, sucres, pigmentation, vitamines A et C).

La *cassure* s'avère une des meilleures mesures utilisables au niveau du champ avec un appareil portatif. Cet indice de fermeté exprime globalement l'importance des tissus de soutien et la turgescence des cellules de carottes, sensible à la déshydratation au stockage. Un indice de *flexion* est complémentaire, sans lien direct avec le précédent.

Les mesures de *cisaillement* ou par *pénétrométrie* sont moins satisfaisantes, dans les conditions expérimentales proposées.

Deux critères analytiques commodes de *jutosité* et de *fibres brutes* sont proposés. Ils ont l'avantage de simplifier les problèmes d'échantillonnage et de population, en permettant d'opérer sur des lots importants de racines de toutes formes et sur des récoltes de toutes origines.

Mots clés : *carottes, texture, rhéologie, composition, qualité, couleur, critères de sélection et de conservation*

---

## Introduction

Un des principaux facteurs de la qualité gustative des carottes est leur tendreté. Une fermeté excessive sous la dent et surtout la présence d'un bâton fibreux dans les vieilles racines entraînent un refus de la part du consommateur. Néan-

moins, d'autres caractères alimentaires intervenant sur l'appétence et l'intérêt diététique peuvent être meilleurs dans les racines à un stade physiologique plus avancé. Ainsi, la couleur est plus intense et la teneur en sucre plus élevée dans les carottes plus âgées (Aubert et Bonnet, 1977; Fritz et Habben, 1973; Kraut, 1974; Michalik et Barowski, 1977).

De plus, à un stade suffisamment développé, les carottes se conservent mieux au froid, en atmosphère normale, pendant 4 à 6 mois à une température voisine de 0° à 1 °C (Afnor, 1967 - NF V25-107; Apeland et Hoftun, 1974; Kovacs et Vœrœs, 1976; Weichmann J. et Kaeppel F., 1977). Les dégradations restent relativement faibles si les racines ont peu de blessures superficielles et sont placées dans une ambiance relativement humide pour éviter le flétrissement (H. R. 93 à 98 p. 100) (Schwarz, 1977; Van Den Berg et Lentz, 1966).

Une atmosphère moins oxygénée (entre 1 et 17 p. 100 selon les conditions d'atmosphère « contrôlée ») (Baumann, 1974; Hansen et Rumpf, 1974; Phan, 1974 *b*; Weichmann et Ammerseder, 1974) devrait permettre d'obtenir encore une meilleure qualité en limitant l'évolution biochimique, faible, mais se produisant même au froid (Feldman *et al.*, 1977; Peskov et Dudkin, 1973; Phan *et al.*, 1973, 1974 *a* et *b*; Weichman *et al.*, 1973 *a* et *b*, 1974, 1977).

Quelques auteurs ont comparé des productions automnales, stockées en entrepôts, avec des récoltes printanières offertes en même temps sur les marchés (Gnaegi, Perraudin et Schopper, 1977). Sur un plan nutritionnel, cette confrontation n'est pas nécessairement en faveur des racines nouvelles, au printemps dans nos régions; car elles peuvent provenir de régions ayant des conditions climatiques particulières plus ou moins propices à cette culture (Balvoll, Apeland et Auranaune, 1976; Bradley *et al.*, 1968, 1969; Hardh J. E. *et al.*, 1972, 1975, 1977; Kraut, 1974; Toul, 1974).

D'une façon générale, les carottes fraîches et récoltées à un stade assez jeune ont une tendreté et une flaveur mieux appréciées; malgré quelques réserves, cette tendance est admise par les consommateurs. Mais il n'y a pas nécessairement opposition entre une texture agréable au palais du dégustateur et une bonne fermeté de la racine (Scheerens et Hosfield, 1976).

En effet, une résistance minimum de la racine est souhaitable pour permettre l'arrachage manuel ou mécanique, le lavage et le conditionnement, l'entreposage en couche épaisse, ainsi que pour éviter un flétrissement indésirable en cours de commercialisation (Berntsen, 1978; Schoneveld, 1973).

Il apparaît que la qualité de texture de la carotte est une notion imprécise qu'il faut définir selon les conditions de récolte et suivant la destination des produits (Afnor 1968-NF V 25-006). Cette qualité diffère pour la consommation ménagère directe et pour la transformation technologique industrielle (Crivelli et Polessello, 1973; Kraut, 1974; Vecher, Pushkina et Reshetnikov, 1978).

Cette diversification des productions est prise en compte par les sélectionneurs, mais les critères utilisés restent souvent rustiques et praticables dans leur contexte de travail (Bonnet, 1975; Buret, 1976; Lane, Peterson et Elliot, 1969).

Les critères physiques de texture, directement en relation avec l'appréciation sensorielle, ne sont pas les plus simples à mettre en œuvre, en particulier si l'on considère les problèmes d'échantillonnage. Les mesures de fermeté doivent se faire généralement, individu par individu, sur une ou plusieurs portions choisies d'une racine. Ainsi la variabilité individuelle et de la population ne s'apprécient souvent qu'à un stade avancé de la sélection, vu les difficultés pratiques.

L'avantage des critères analytiques de la constitution biochimique, par

exemple la teneur en fibres, est de pouvoir être appliqué en une seule mesure à une masse réduite d'un lot homogénéisé représentatif d'une récolte.

Le but principal de notre travail est de révéler les corrélations qui peuvent exister entre ces deux types de mesures, afin de proposer une simplification des critères de sélection. L'analyse sensorielle objective a été proposée pour suppléer à l'imprécision des classements hédoniques de dégustateurs entraînés ou non (SCHUTZ, DAMRELL et LOCKE, 1972).

Cette étude, concernant principalement la résistance mécanique à la casse, n'appréhende pas un autre phénomène assez fréquent chez la carotte : l'éclatement, radial ou longitudinal, de la racine soit en cours de végétation soit au moment de la récolte et plus précisément du lavage. La sensibilité à l'éclatement est partiellement héréditaire (BIENZ, 1965, 1968; DICKSON, 1966).

Par ailleurs, la turgescence des tissus et, par opposition, le ramollissement des racines exposées à l'étalage seraient fonction de la force de rétention de l'eau de la racine; de plus, une légère subérisation des assises externes du cortex peut modifier sensiblement la qualité des carottes (DORRELL et CHUBEY, 1972; KRUG et BAUR, 1973; VOLKIND et LOBANOVA, 1972).

Des spécialistes se sont penchés sur les divers aspects de la qualité de texture des carottes; plus particulièrement, la fermeté est évaluée par des tests de pénétration — cisaillement (BOURNE, 1966; HOWARD et HEINTZ, 1970) ou par la mesure des forces radiales de compression — élasticité des tissus (KAPSALIS, SEGARS et KRIZIK, 1972; SNOBAR, 1974; SEGERLIND, SNOVAR et HELDMAN, 1977).

Ces indices peuvent différencier des stades de récolte ou des pratiques culturales, ou permettre de suivre l'évolution des racines en cours de conservation. Néanmoins, leur utilisation est discutable pour la sélection des variétés si l'on ne tient pas suffisamment compte de l'hétérogénéité des caractères morphologiques des racines; les extrapolations à partir de résultats partiels obtenus, sur un calibre ou une « géométrie » choisis conventionnellement, traduisent mal les caractéristiques d'une population.

Ces réserves montrent la difficulté du problème posé aux sélectionneurs et la nécessité de mettre au point de nouveaux critères, physiques ou biochimiques, plus simples que les précédents et capables de s'adapter à des carottes de toutes formes et de toutes origines.

## Matériel et méthodes

### A. — Matériel végétal

#### a) *Origines et Variétés*

L'étude a porté sur sept lots assez voisins du type demi-longue nantaise : la variété « *Touchon* », les hybrides F1 « *Nandor* », « *Tancar* », « *Tiana* » (obtention Clause), « *Cathy* » (obtention Caillard) déjà commercialisés, les hybrides F1 expérimentaux 73-02 et 74-02 (obtention INRA).

Leurs racines correspondent à des caractères morphologiques bien acceptés sur le marché français et européen.

Le semis fut effectué le 8 août 1977; deux récoltes eurent lieu : le 28 novembre 1977 et le 9 janvier 1978.

A titre de comparaison, nous avons également étudié deux variétés de grande diffusion en Pologne (troisième producteur de l'Europe de l'Est) : « *Nantejska* » et « *Perfekcja* ». Elles se caractérisent par leur récolte estivale dans des conditions de culture particulièrement favorables et par leur stockage pendant plusieurs mois : « *Nantejska* » a été conservée en silo naturel en terre, « *Perfekcja* » en entrepôt frigorifique. Elles sont de calibre assez gros et d'une fermeté relativement élevée mais bien acceptée par les consommateurs. Ces deux lots, qui avaient donc été conservés pendant au moins 3 mois, furent fournis directement par un chercheur polonais (B. Szot); ils nous ont servi de repères pour situer les qualités physiques et biochimiques compatibles avec une bonne conservation en entrepôts.

(Ces modes de conservation n'ont pas beaucoup la faveur des producteurs français, plus particulièrement les méridionaux, qui préfèrent les récoltes tardives de plein champ, malgré les risques que comportent les cultures hivernales, même en régions tempérées. Les possibilités de conservation de la production française feront l'objet d'une autre publication.)

### b) *Échantillonnage et classification*

Après lavage à la main dans un courant d'eau, chaque récolte d'une variété est triée en éliminant les individus mal formés, cassés, trop petits ou trop gros.

Pour des raisons matérielles, on a dû se limiter à étudier une centaine de racines par variété et par récolte. Chaque lot est ensuite partagé en classes de calibres conventionnels pris selon la répartition suivante :

classe 1 : diamètre inférieur à 21 mm
classe 2 : diamètre entre 21 et 25 mm
classe 3 : diamètre entre 25 et 27 mm
classe 4 : diamètre entre 27 et 30 mm
classe 5 : diamètre supérieur à 30 mm

Le diamètre est mesuré à mi-hauteur de la racine. La très grande majorité des racines se situe dans les classes 2, 3 et 4. La classe 3, la plus étroite, est aussi la plus nombreuse pour l'ensemble des récoltes et des variétés étudiées. Mais elle ne correspond pas nécessairement à la moyenne d'une répartition en « courbe de Gauss », chaque variété étant plus ou moins centré sur cette valeur moyenne selon ses caractéristiques morphologiques et le stade de récolte de l'échantillon considéré (100 racines). Ainsi les « petites » carottes de « *Cathy* » sont plus fréquentes dans la classe 2; les variétés polonaises, dans la classe 4; mais toutes les autres ont une courbe de répartition très étalée centrée sur la classe 3.

Toutefois, les analyses de composition sont faites sur des racines prises dans les classes 2, 3 et 4 afin d'avoir une meilleure expression biochimique du stade physiologique atteint à chaque récolte (prélèvements en onglets longitudinaux sur une quarantaine de racines par lot).

Par contre, les mesures de texture ne portent que sur 10 à 20 racines, prises uniquement dans la classe 3 de chaque variété. Ce choix arbitraire se justifie par la prise en compte du facteur calibre qui est apparu prépondérant dans diverses mesures de fermeté au cours des essais préliminaires.

D'une façon schématique et discutable, si les analyses biochimiques permettent de différencier les variétés et les récoltes, les mesures physiques traduisent mieux les paramètres morphologiques et mécaniques, d'où la nécessité de diminuer la variabilité prévisible due à la section et la géométrie des racines.

Cette simplification expérimentale sur l'échantillonnage a permis de chiffrer l'évolution de la texture des carottes après 6 jours de stockage dans les conditions ambiantes à 20 °C, dans un local ventilé et sur des plateaux sans protection spéciale, telles qu'elles sont présentées à l'étalage sur le marché. Un flétrissement très sensible apparaît, lié à la déshydratation. Cette caractéristique varie fortement d'une variété à une autre et pourrait être corrélée, *à priori*, avec la teneur en sucres ou celle en matières sèches mesurées sur chaque récolte fraîche.

## B. — Mesures physiques

### a) *Critères de texture*

Ils ont été mis au point par l'un de nous (B. SZOT) à partir d'un appareillage utilisé à la Station de Technologie des Produits Végétaux d'Avignon - Montfavet pour la mesure de fermeté des divers fruits et légumes (pénétromètre FERRY - I.N.R.A.). Son avantage principal est sa polyvalence pour une gamme très étalée de forces appliquées sur une capsule manométrique dont on enregistre les déformations. Divers dispositifs d'adaptation à la carotte (voir fig. 1) ont permis 4 types de mesures qui cernent la qualité de texture de la carotte.

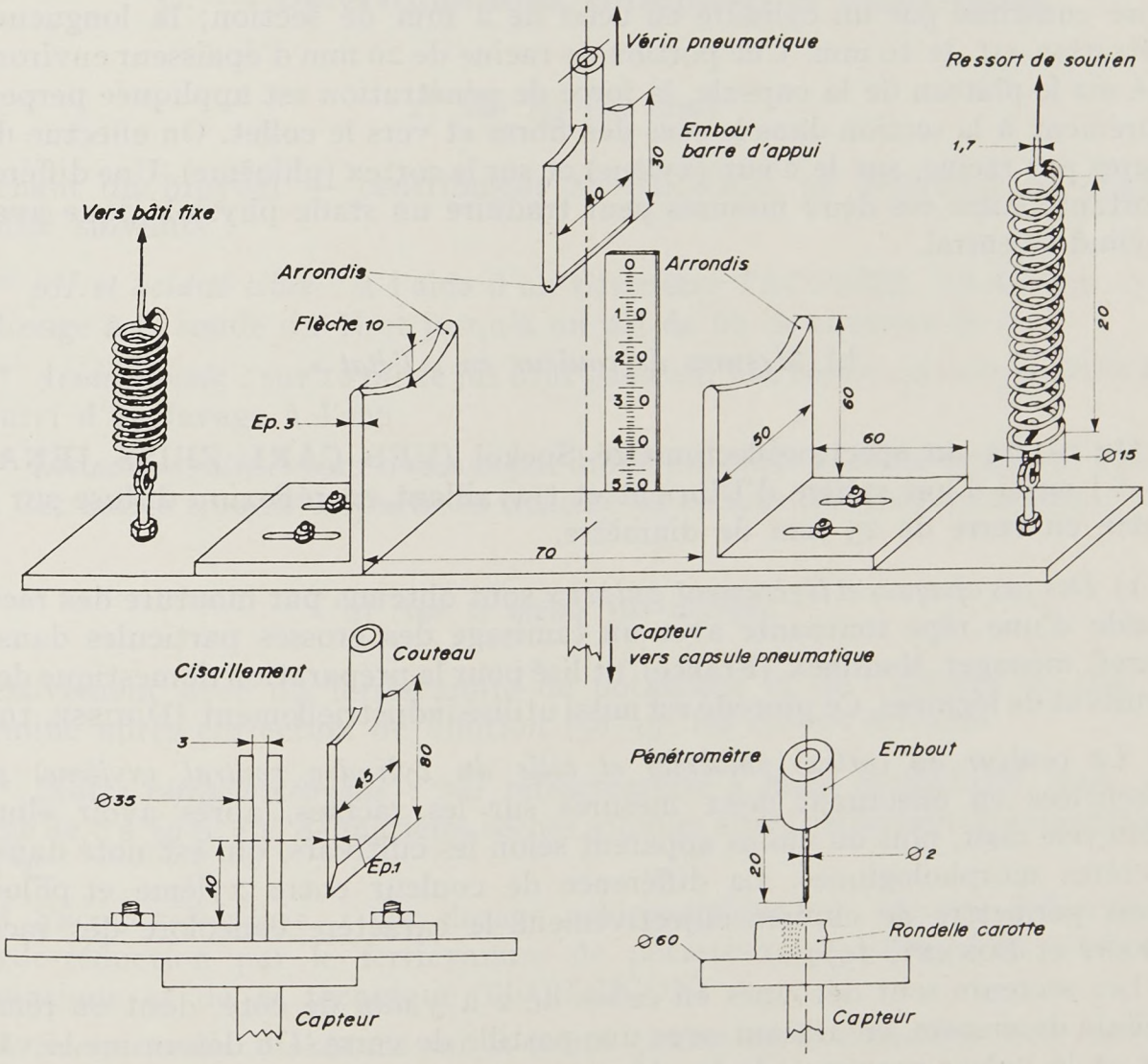



FIG. 1. — *Schéma des dispositifs pour mesures de texture.*

1) *Cassure.* — On enregistre la force de déformation jusqu'au point limite de cassure, de chaque racine placée sur deux supports distants de 70 mm (valeur moyenne convenable établie préalablement dans nos essais). Une commande pneumatique abaisse très lentement un embout arrondi prenant appui sur le milieu de la racine, sans traumatisme ni cisaillements apparents (points d'appuis arrondis). Après une flexion continue, la cassure est enregistrée. Le capteur (capsule élastique) transmettant les forces est soumis à une contre-pression pneumatique interne pour limiter la déformation de la membrane. Dans le même but, des ressorts de soutien permettent de rester dans une zone d'élasticité compatible avec un étalonnage satisfaisant et reproductible, dans une gamme de forces de 3 à 20 kg.

2) *Flexion.* — Avec le même montage, on mesure la flèche maximum de la racine obtenue entre les 3 points d'appui au moment de la cassure.

3) *Cisaillement.* — Chaque racine est placée dans une « guillotine » constituée par deux lames guides distantes de 3 mm et comportant une ouverture circulaire de 35 mm. Le couteau a une lame horizontale de faible épaisseur (1 mm) pour éviter les efforts en « coin », faisant intervenir des résistances par compression latérale. La force passe par un maximum après avoir sectionné environ la moitié de la carotte. L'étalonnage se fait dans une gamme de forces de 1 à 5 kg, à l'aide de poids posés directement sur le plateau du détecteur de pression.

4) *Pénétromètre.* — On utilise le montage habituel avec un doigt mécanique calibré constitué par un cylindre en acier de 2 mm de section; la longueur de pénétration est de 10 mm. Une portion de racine de 20 mm d'épaisseur environ est placé sur le plateau de la capsule; la force de pénétration est appliquée perpendiculairement à la section dans le sens des fibres et vers le collet. On effectue deux mesures par racine, sur le cœur (xylène) et sur le cortex (phloème). Une différence importante entre ces deux mesures peut traduire un stade physiologique avancé du cylindre central.

### b) *Mesures de couleur en « l'état »*

On utilise un spectroréflectomètre Spekol (VEB CARL ZEISS JENA — R.D.A.) muni d'une sphère d'Ulbricht et travaillant en réflexion diffuse sur une cuvette en verre de 25 mm de diamètre.

1) *Des jus opaques et légèrement pulpeux* sont obtenus par mouture des racines à l'aide d'une râpe tournante avec un tamisage des grosses particules dans un appareil ménager Moulinex (France) utilisé pour la préparation domestique de jus de fruits et de légumes. Ce procédé est aussi utilisé industriellement (Dousse, 1978).

2) *La couleur du cortex (phloème) et celle du cylindre central (xylème)* sont différenciées en effectuant deux mesures sur les racines, après avoir éliminé le péricycle clair, plus ou moins apparent selon les cultivars, qui est noté dans les caractères morphologiques. La différence de couleur entre xylème et phloème devrait permettre de chiffrer objectivement le caractère concolore des racines (Aubert et Bonnet, 1977).

Les secteurs sont découpés en cubes de 2 à 3 mm de côté, dont on remplit la cellule de mesure, en arasant avec une pastille de verre. On détermine la variabilité et la valeur moyenne de la réflectance, pour une longueur d'onde donnée,

en faisant tourner la cellule de mesure devant la raie venant du monochromateur; on prend en compte dans cette moyenne les mesures correspondant à trois remplissages successifs de la cuve de verre pour le même échantillon rehomogénéisé.

c) *Fibres brutes*

Après avoir noté le volume et le poids de jus recueilli sur une fraction aliquote pesée des onglets longitudinaux de racines prélevés et passés à l'extracteur MOULINEX, les particules recueillies sur le tamis centrifuge sont séchées dans une coupelle d'aluminium.

Après homogénéisation et séchage à poids constant à 100-103 °C, les fibres sont pesées. Le rapport poids sec sur poids de matière fraîche initiale des carottes prélevées donne le taux de fibres brutes.

Une correction de la teneur en sucres de l'extrait sec peut être effectuée d'après le poids d'eau retenu par les fibres; le taux de fibres brutes purifiées est alors nettement plus faible (moins 50 p. 100 environ), mais cet indice « corrigé » est apparu, après plusieurs expériences, moins intéressant, moins sensible et moins significatif que le premier (voir interprétation dans la dicussion pages 415 et 418).

## C. — Déterminations chimiques et analytiques

1) *Sur les jus bruts*

provenant du broyeur — centrifugeur MOULINEX, on détermine les critères d'acidité suivants :

* *pH et acidité libre :* à l'aide d'un titrimètre TACUSSEL TS 4N sur 20 ml par dosage à la soude 0,1 N et jusqu'à un pH de fin de titration de 8,1.

* *Acidité totale :* sur 10 ml de jus brut passé sur une résine cationique DOWEX 50, suivi d'un lavage à l'eau.

* *Les acides salifiés* sont obtenus par différence entre l'acidité totale et l'acidité libre. Cet indice traduit en partie la richesse en cations fixés sur les acides.

2) *Sur le même jus déféqué*

successivement avec du ferricyanure de potassium et de l'acétate de zinc, on détermine après correction de dilution (50/55) les indices suivants :

* *Indice réfractométrique :* sur réfractomètre à main SOPELEM, dans une gamme de 0 à 30 p. 100 de matières sèches solubles après correction de température à 20 °C.

* *Sucres réducteurs :* par dosage colorimétrique, en mesure différentielle d'oxydo-réduction par le ferricyanure de potassium, à l'aide d'un analyseur automatique et de la technique TECHNICON.

* *Sucres totaux :* obtenus sur la même chaîne après hydrolyse enzymatique préalable des jus à l'aide d'invertase (E.C.3.2.1.26).

* *Vitamine C* : l'acide dehydroascorbique total est dosé après oxydation par le brome de l'acide ascorbique et formation de dinitrophenylhydrazone (3 h de réaction à 37 °C), solubilisée à froid dans l'acide sulfurique et suivi d'un dosage colorimétrique à 524 nm.

### 3) *Sur une fraction aliquote*

des secteurs de carottes échantillonnés pour les analyses précédentes, on prépare une pulpe homogénéisée, diluée avec une partie égale d'eau dans un mixer VORWERK (pendant 1 mn à vitesse maximum 18 000 t /mn) et on prélève rapidement, avec agitation, deux fractions en vue des dosages suivants :

* *Caroténoïdes totaux* : environ 25 g de pulpe diluée précédente sont pesés dans un flacon de 250-300 ml et mis en diffusion au froid une nuit (15 h à 4 °C) dans 150 ml du mélange solvant : Éthanol-Acétone-Chloroforme (50 p. 100 alcool + 50 p. 100 acétone en volumes, puis 5 p. 100 de chloroforme par rapport au mélange binaire). On filtre sur verre fritté n° 3 avec un lit de celite 545 (R.P.) de 5 mm; on recueille le filtrat en ballon jaugé de 250 ml et on complète avec les lavages. Puis, on mesure la densité optique de la solution à 450 nm.

Les caroténoïdes sont évalués en β-carotène pur étalon selon la méthode de Fiasson, Arpin et Lebreton (1969); on admet un cœfficient d'extinction spécifique de 2 500; ceci compte-tenu de la forte proportion en β-carotène (90 p. 100 en général pour les variétés de carottes connues) et du mélange solvant ternaire adopté.

* *Matières cellulosiques et pectiques ou matières insolubles dans l'alcool* (M.I.A.) (Southgate, Hudson et Englyst, 1978). Environ 30 g de pulpe diluée au mixer sont versés dans 300 ml d'éthanol (96 °GL) à ébullition et maintenus au reflux 10 minutes. On filtre sur buchner de diamètre 50 mm muni d'un papier filtre rapide séché et pesé. On récupère la partie insoluble, lavée avec 50 ml d'éthanol, puis essorée sous vide. Le résidu fibreux est séché en étude à 100-103 °C jusqu'à poids constant. Le rapport poids de résidu sec sur matière fraîche prélevée (environ 15 g) donne le taux de M.I.A., constituées essentiellement de fibres ligneuses et cellulosiques purifiées et de substances pectiques insolubles fixées aux parois cellulaires (cet indice devrait être plus représentatif de la charpente des tissus racinaires que l'indice fibres brutes précédent).

## Résultats

Les deux récoltes, des sept variétés expérimentées à Avignon-Montfavet, sont séparées par un intervalle de un mois et demi (28 novembre 77 et 9 janvier 78), afin de tenir compte du facteur précocité dans un environnement particulier. Le but de ce travail n'est pas de comparer exhaustivement quelques sélections de carottes avant leur diffusion sur le marché, mais seulement de mettre en évidence des critères caractérisant les différences variétales. Dans notre contexte expérimental, ce minimum de 2 cueillettes peut être suffisant pour révéler globalement l'influence attendue des nombreux paramètres intervenant dans les conditions de récolte des lots de racines prélevés.

TABLEAU I

*Mesures physiques sur carottes*

| Cultivars | Première récolte à Montfavet | | | | | | | Pologne |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | FI 73-02 | FI 74-02 | « Tiana » | « Tancar » | « Nandor » | « Cathy » | « Touchon » | « Nantejska » |
| *Racines fraîches :* | | | | | | | | |
| Cassure | 10,21 | 12,94 | 9,47 | 8,61 | 8,02 | 8,15 | 6,51 | 14,64 |
| Flexion | 6,73 | 7,50 | 6,55 | 6,60 | 5,92 | 6,10 | 5,42 | 5,14 |
| Cisaillement | 1,78 | 2,30 | 1,67 | 1,76 | 1,86 | 1,67 | 1,57 | 3,44 |
| Pénétromètre Xylème | 1,18 | 1,26 | 1,15 | 1,06 | 1,18 | 1,09 | 0,99 | 1,33 |
| Pénétromètre Phloème | 1,06 | 1,10 | 1,12 | 1,02 | 1,04 | 1,05 | 0,93 | 1,18 |
| Conservation 6 jours — Perte d'eau en p. 100 | 10,08 | 5,34 | 7,03 | 16,83 | 6,98 | 9,28 | 15,80 | 16,26 |
| *Racines conservées :* | | | | | | | | |
| Cassure | 7,59 | 9,15 | 8,34 | 6,69 | 8,45 | 7,15 | 7,01 | 12,65 |
| Flexion | 10,53 | 10,08 | 9,25 | 14,10 | 9,08 | 10,36 | 11,64 | 8,92 |
| Cisaillement | 1,91 | 2,11 | 2,09 | 1,54 | 2,18 | 1,61 | 1,74 | 3,04 |
| Pénétromètre Xylème | 1,12 | 1,25 | 1,18 | 1,04 | 1,08 | 1,05 | 0,94 | 1,28 |
| Pénétromètre Phloème | 0,93 | 1,05 | 0,95 | 0,94 | 0,96 | 0,96 | 0,90 | 1,14 |

TABLEAU 2

*Mesures physiques sur carottes*

| Cultivars | Deuxième récolte à Montfavet | | | | | | | Pologne |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fi 73-02 | Fi 74-02 | « Tiana » | « Tancar » | « Nandor » | « Cathy » | « Touchon » | « Perfekcja » |
| *Racines fraîches :* | | | | | | | | |
| Cassure | 14,36 | 13,91 | 11,75 | 13,95 | 13,32 | 12,36 | 11,51 | 17,09 |
| Flexion | 6,00 | 7,10 | 6,00 | 6,50 | 5,91 | 4,90 | 4,90 | 5,90 |
| Cisaillement | 2,44 | 2,42 | 2,56 | 3,17 | 2,23 | 2,42 | 2,63 | 3,19 |
| Pénétromètre Xylème | 1,22 | 1,37 | 1,31 | 1,27 | 1,17 | 1,19 | 1,21 | 1,16 |
| Pénétromètre Phloème | 1,17 | 1,19 | 1,20 | 1,19 | 1,12 | 1,15 | 1,12 | 1,13 |
| Conservation 6 jours — Perte d'eau en p. 100. | 21,60 | 15,28 | 29,38 | 18,72 | 21,40 | 11,25 | 21,91 | 21,22 |
| *Racines conservées :* | | | | | | | | |
| Cassure | 11,50 | 11,62 | 8,53 | 10,66 | 8,20 | 8,18 | 8,08 | 15,87 |
| Flexion | 11,85 | 14,64 | 14,75 | 13,80 | 10,85 | 9,71 | 12,63 | 12,40 |
| Cisaillement | 2,43 | 2,45 | 2,25 | 2,40 | 2,22 | 2,02 | 2,06 | 3,25 |
| Pénétromètre Xylème | 1,20 | 1,24 | 1,08 | 1,04 | 1,27 | 1,06 | 1,13 | 1,23 |
| Pénétromètre Phloème | 1,02 | 1,00 | 0,86 | 0,91 | 1,07 | 0,93 | 0,96 | 1,12 |

TABLEAU 3

*Composition des carottes*

| Analyses | Première récolte à Montfavet | | | | | | | Pologne |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F1 73-02 | F1 74-02 | « Tiana » | « Tancar » | « Nandor » | « Cathy » | « Touchon » | « Nantejska » |
| Poids moyen (g) | 53 | 56 | 57 | 59 | 61 | 48 | 61 | 82 |
| Jutosité (p. 100/poids) | 64,6 | 62,9 | 62,0 | 63,6 | 66,0 | 65,6 | 67,0 | 59,4 |
| Fibres brutes séchées (p. 100) | 5,30 | 5,77 | 5,50 | 5,48 | 5,10 | 5,18 | 5,05 | 6,60 |
| Matières insolubles Alcool (p. 100) | 3,59 | 4,19 | 3,85 | 4,05 | 3,86 | 3,68 | 3,68 | 4,43 |
| *Sucres* totaux (g/l) | 72,3 | 67,1 | 73,3 | 73,3 | 69,7 | 71,3 | 70,4 | 72,6 |
| *Sucres* réducteurs (g/l) | 38,3 | 39,1 | 35,9 | 37,8 | 33,0 | 37,6 | 42,5 | 26,0 |
| *Sucres* saccharose (g/l) | 33,9 | 28,0 | 37,4 | 35,5 | 36,7 | 33,7 | 27,9 | 46,6 |
| Matières sèches solubles (p. 100) | 9,00 | 8,80 | 9,25 | 9,15 | 9,15 | 9,00 | 8,90 | 10,00 |
| *Acidité* : pH du jus | 6,24 | 6,25 | 6,40 | 6,29 | 6,24 | 6,29 | 6,26 | 6,38 |
| — libre (meq/l) | 5,8 | 3,7 | 8,8 | 9,0 | 9,9 | 8,3 | 9,3 | 12,3 |
| — totale (meq/l) | 88,3 | 97,2 | 87,9 | 82,9 | 87,0 | 74,9 | 78,0 | 80,0 |
| — salifiée (meq/l) | 82,6 | 93,5 | 79,1 | 73,9 | 77,1 | 66,1 | 68,7 | 67,6 |
| *Vitamine C* (mg p. 100 g mat. fraîche) (en A.D.H. ascorbique) | 6,17 | 6,67 | 6,01 | 5,36 | 4,81 | 6,86 | 5,02 | 5,7 |
| *Caroténoïdes* (mg p. 100 g mat. fraîche) (en β-carotène) | 8,8 | 9,0 | 10,5 | 13,2 | 10,0 | 8,4 | 7,4 | 12,6 |
| *Couleur sur jus* (p. 100) (réflectométrie à 550 nm) | 36,1 | 37,8 | 32,5 | 32,7 | 33,5 | 33,8 | 32,0 | 34,62 |
| *Couleur sur racines* (réflectométrie à 575 nm) xylème | 20,26 | 20,36 | 18,90 | 17,54 | 16,12 | 20,64 | 18,12 | 21,62 |
| *Couleur sur racines* (réflectométrie à 575 nm) phloème | 25,10 | 28,22 | 23,92 | 21,94 | 21,26 | 21,34 | 22,48 | 22,66 |

TABLEAU 4

*Composition des carottes*

| Analyses | Deuxième récolte à Montfavet | | | | | | | Pologne |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F1 73-02 | F1 74-02 | « Tiana » | « Tancar » | « Nandor » | « Cathy » | « Touchon » | « Perfekcja » |
| Poids moyen (g) | 62 | 65 | 58,5 | 66,5 | 75 | 54,5 | 60 | 126 |
| Jutosité (p. 100/poids) | 61,66 | 59,75 | 61,65 | 63,4 | 62,6 | 62,15 | 64,20 | 59,35 |
| Fibres brutes séchées (p. 100) | 5,72 | 5,93 | 5,30 | 5,56 | 5,44 | 5,18 | 5,06 | 6,08 |
| Matières insolubles alcool (p. 100) | 4,05 | 4,66 | 3,58 | 4,11 | 3,57 | 3,50 | 3,40 | 4,63 |
| *Sucres* totaux (g/l) | 80,1 | 75,9 | 74,4 | 77,2 | 70,8 | 62,5 | 62,3 | 79,2 |
| *Sucres* réducteurs (g/l) | 38,3 | 37,6 | 30,4 | 31,5 | 29,0 | 28,8 | 32,1 | 31,0 |
| *Sucres* saccharose (g/l) | 41,8 | 38,3 | 44,0 | 45,7 | 41,8 | 33,7 | 30,2 | 48,2 |
| Matières sèches solubles (p. 100) | 9,9 | 9,6 | 9,7 | 10 | 9,5 | 9,1 | 8,9 | 9,0 |
| *Acidité* : pH du jus | 6,28 | 6,33 | 6,54 | 6,55 | 6,52 | 6,64 | 6,58 | 6,22 |
| — libre (meq/l) | 9,5 | 9,6 | 9,2 | 9,1 | 8,4 | 7,35 | 8,15 | 12,70 |
| — totale (meq/l) | 88,5 | 92,4 | 84,3 | 81,2 | 79,3 | 79,40 | 66,20 | 100,80 |
| — salifiée (meq/l) | 79 | 82,8 | 75,1 | 72,1 | 70,9 | 72,05 | 58,15 | 88,10 |
| *Vitamine C* (mg p. 100 g mat. fraîche) (en A.D.H. ascorbique) | 4,73 | 4,68 | 4,19 | 3,85 | 4,54 | 5,43 | 4,19 | 6,32 |
| *Caroténoïdes* (mg p. 100 g mat. fraîche) (en β-carotène) | 9,3 | 8,5 | 8,0 | 10,0 | 10,1 | 8,6 | 7,0 | 11,6 |
| *Couleur sur jus* (p. 100) (réflectométrie à 550 nm) | 35,02 | 32,84 | 33,36 | 34,12 | 35,10 | 35,64 | 33,52 | 31,36 |
| *Couleur sur racines* (réflectométrie à 575 nm) xylème | 24,64 | 24,12 | 18,92 | 16,30 | 18,50 | 20,46 | 21,18 | 22,96 |
| *Couleur sur racines* (réflectométrie à 575 nm) phloème | 26,32 | 28,30 | 23,44 | 22,40 | 21,02 | 22,50 | 24,16 | 22.54 |

Dans ces deux séries d'analyses, on a introduit respectivement les variétés polonaises « *Perfekcja* » et « *Nantejska* » ayant au moins 3 mois de conservation, à côté des récoltes fraîches; ceci afin d'avoir un témoin représentatif d'une production ayant une qualité de texture ferme et apte à une longue conservation. Ce classement arbitraire ne devrait pas perturber l'interprétation statistique des corrélations recherchées entre les critères observées : le « poids » des données différentes, *à priori*, d'une variété étrangère ne devrait pas être excessif par rapport aux différences existant entre les sept autres variétés.

Les critères physiques de texture sont regroupés dans les tableaux 1 et 2, correspondant aux deux récoltes. Après évolution à l'air et température ambiante, des échantillons comparables sont mesurés, dans les mêmes conditions, une fois chiffrée la déshydratation des racines entières. Seules les moyennes obtenues sur chaque lot sont données sans tenir compte de la variabilité individuelle, notre but n'étant pas la confrontation des variétés entre elles.

Les critères de composition biochimique et physique des racines coupées fraîches font l'objet des tableaux 3 et 4, comportant aussi les mesures de couleur.

A partir de ces observations isolées, toutes les corrélations possibles 2 à 2 sont rassemblées dans les tableaux 5 à 7. Il nous semble préférable de dissocier les corrélations partielles obtenues pour chaque série d'analyse (8 variétés) des corrélations globales obtenues sur l'ensemble des 16 observations; ces dernières, étant nécessairement biaisées par le facteur date de récolte, sont moins intéressantes que le caractère éventuellement répétitif des corrélations partielles précédentes.

Cette approche du problème et les interprétations qui peuvent être faites devront être confirmées ultérieurement par des essais systématiques, dans un nouveau contexte expérimental, en tenant compte des critères de sélection les plus intéressants révélés par cette étude.

## Discussion

### 1. — *Intérêt des différents critères de texture*

Chacun des critères proposés a sa valeur propre et les nombreuses corrélations trouvées ne permettent pas de simplifications hâtives, mais elles font entrevoir des choix possibles pour les Sélectionneurs.

*a*) La cassure et le cisaillement ont des liens évidents (tabl. 1 et 2). Ainsi les deux témoins étrangers sont objectivement plus fermes que les lots des deux récoltes faites dans nos régions. La sensibilité de ces deux indices est bonne et permettrait éventuellement une discrimination des lots, avec un échantillonnage approprié. Néanmoins, le premier indice est le meilleur pour exprimer globalement la qualité de texture pour plusieurs raisons : La force de cassure diminue généralement avec la déshydratation des racines, alors que le cisaillement est peu modifié, dans les limites de variabilité des lots. Cet indice de solidité des racines fraîches (CASS. 1) demeure cependant corrélé (tabl. 5 à 7) avec la cassure (CASS.2) et le cisaillement des carottes conservées (CIS. 2), ainsi qu'avec les mesures au pénétromètre dans le phloème ou le cortex.

Pratiquement, les carottes ayant la texture la plus résistante en frais restent aussi les plus fermes après une courte conservation à l'étalage, tandis qu'une baisse sensible de la turgescence se produit dans les couches les plus externes des racines.

TABLEAU 5 : *Corrélations sur la première récolte (plus « nantesjka »)*

| | P.M. | JUS | F.B. | M.I.A. | I.R. | S.T. | S.R. | S. | PH | A.L. | A.T. | A.S. | VIT. C | Carotène | R. Jus | R.XY. | R.PH. | CASS. 1 | FLEX. 1 | CIS. 1 | P.XY. 1 | P.PH. 1 | $H_2O$ | CASS. 2 | FLEX. 2 | CIS. 2 | P.XY. 2 | P.PH.2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Poids moyen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Jutosité | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fibre brute | ** | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M. Ins. Alcool | ** | ** | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I. refracto | *** | ** | ** | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sucres totaux | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sucres réducteurs | ** | * | ** | * | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Saccharose | ** | * | * | | *** | * | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH | | ** | | | ** | | | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidité libre | * | | | | ** | | * | ** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidité totale | | | | | | | | | | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidité salifiée | | | | | | | | | | ** | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vitamine C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| β Carotène | | * | * | | * | | * | ** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Réflect. jus | | | | | | | | | | * | * | ** | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Réflect. xylème | | | | | | | | | | ** | ** | *** | | | ** | | | | | | | | | | | | | |
| Réflect. phloème | | | | | | | | | | | | | ** | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cassure 1 | | *** | *** | ** | | | * | | | | * | * | | | * | | * | | | | | | | | | | | |
| Flexion 1 | * | | | | | | | | | *** | ** | *** | | | | ** | | | | | | | | | | | | |
| Cisaillement 1 | *** | ** | *** | *** | ** | | ** | * | | | | | | | | | | *** | | | | | | | | | | |
| Pénétr. xylème 1 | | ** | ** | * | | | ** | | | | | | | | * | | | *** | | *** | | | | | | | | |
| Pénétr. phloème 1 | | *** | ** | * | * | | ** | * | * | | | | | | | | | *** | | ** | *** | | | | | | | |
| Perte d'eau | | | | | | | | | | | | * | * | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cassure 2 | *** | ** | *** | ** | ** | | *** | ** | | | | | | | | | | *** | | *** | *** | ** | | | | | | |
| Flexion 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | * | | | * | | | | |
| Cisaillement 2 | *** | ** | ** | ** | ** | | *** | ** | | | | | | | | | | ** | | *** | *** | ** | | *** | * | | | |
| Pénétr. xylème 2 | | *** | ** | ** | | | * | | | | | | | | * | | | *** | | ** | *** | *** | | ** | | ** | | |
| Pénétr. phloème 2 | * | ** | *** | *** | * | | ** | | | | | | | | | | | *** | | *** | *** | ** | | *** | | *** | *** | |

*Légende* :

Corrélations négatives ou inverses = le signe moins est placé sous le niveau de signification :

*** = très significatif (P supérieur ou égal à 0,01)

** = significatif (P entre 0,01 et 0,05)

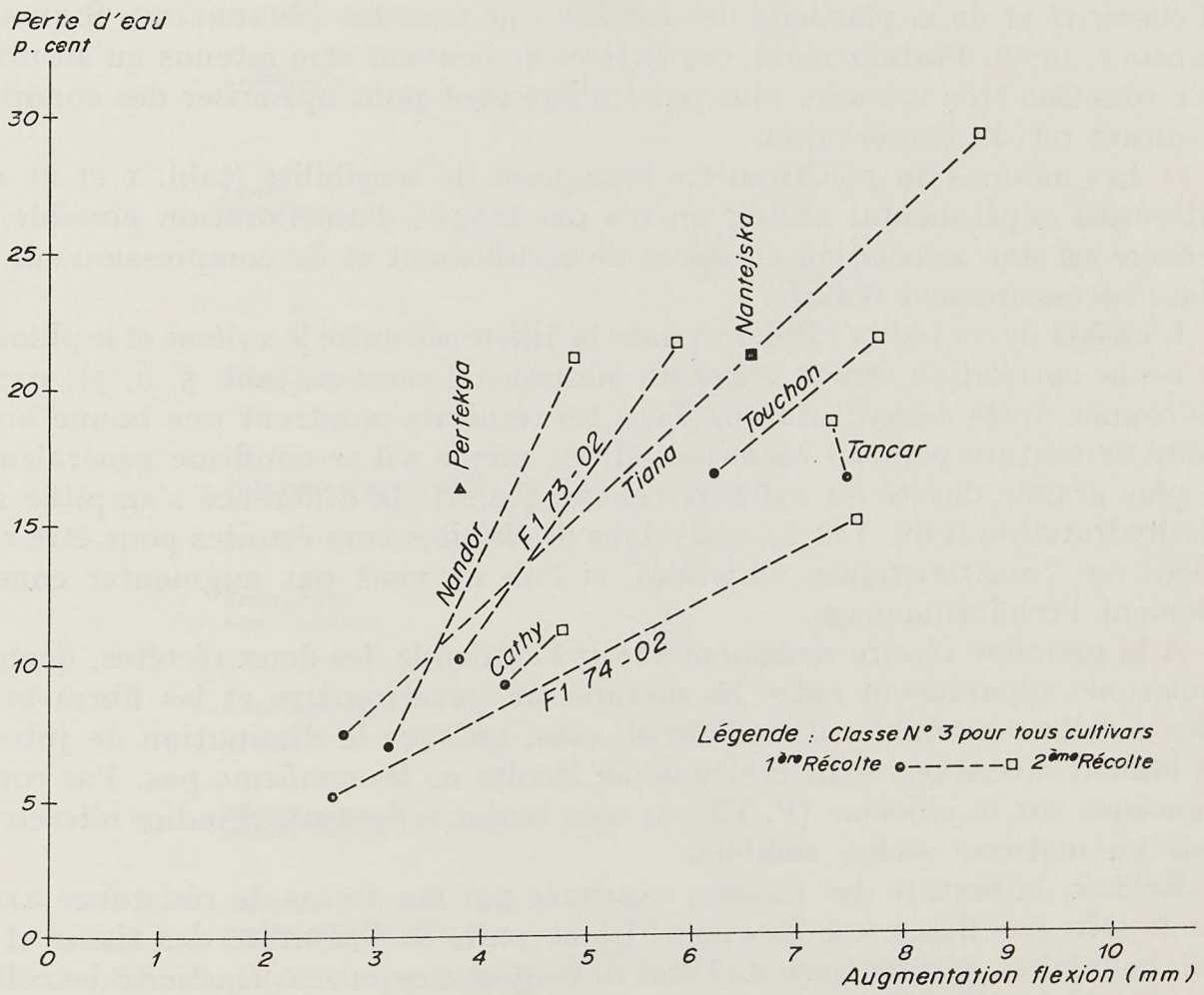
* = probable ou possible (P entre 0,05 et 0,10)

Cette observation commune (SEGERLIND, SNOVAR et HELDMAN, 1977) sur le ramollissement périphérique des carottes semble en contradiction apparente avec l'absence de corrélation significative entre la perte d'eau et les autres critères physiques ou chimiques analysés, avant comme après déshydratation. De même, on peut être étonné par une constatation allant dans le même sens : les indices de flexion n'apparaissent pas liés avec les autres critères.

*b*) La flexion ou flèche des racines, exprimant l'élasticité des tissus ou leur plasticité longitudinale, est un indice grossier de flétrissement appréciable par les utilisateurs dans un protocole manuel (MACKEY, HARD et ZAEHRINGER, 1973).

Ce caractère, peu sensible sur les racines fraîches, ne permet pas de différencier les lots (tabl. 1 et 2). Il évolue fortement en cours de conservation, si l'on ne prend pas de précautions contre la déshydratation. Mais on ne trouve pas de corrélation significative (à un niveau inférieur à 0,10) entre la mesure objective faite et les autres critères de texture ou de composition analysés dans cette étude, du moins de façon répétée (tabl. 5 à 7), avant (FLEX. 1) comme après déshydratation (FLEX. 2).

En effet, dans la première récolte (tabl. 5), la flexion I est corrélée avec l'acidité et plus particulièrement avec les acides salifiés. Ce qui signifierait une influence possible des facteurs agronomiques qu'il faudra préciser. Mais dans la deuxième récolte (tabl. 6), les seules corrélations significatives concernent la flexion des racines fraîches avec les fibres brutes, matières insolubles dans l'alcool et sucres




GRAPHIQUE 1. — *Relation entre la déshydratation et l'augmentation de la flexion des racines*

*Légende : Classe N° 3 pour toutes les variétés*
1re Récolte ——————— 2e Récolte

totaux. Sur l'ensemble des deux récoltes, la première observation est confirmée (tabl. 7); une acidité faible et une salification importante sont favorables à une flexibilité plus grande des racines fraîches, ce qui n'est pas le cas après ramollissement (FLEX. 2). Toutefois, pour les variétés étudiées et dans nos conditions expérimentales, la corrélation flexion — perte d'eau n'est pas significative sur chaque récolte, sauf pour l'ensemble des deux récoltes (tabl. 7).

Cependant, un lien probable existe entre la déshydratation et le ramollissement ou augmentation de la flexion des racines, après 6 jours de stockage dans l'atmosphère ambiante (graphique 1). Il reste à dissocier l'influence des conditions de récolte ou de conservation des différences dues aux caractéristiques des cultivars; ceci suppose des expérimentations très laborieuses.

La supériorité de la variété « *Cathy* » sur « *Touchon* », par exemple, dans la résistance au ramollissement et à la déshydratation à l'air serait intéressante. De même, le comportement des lots témoins étrangers « *Perfekcja* » et « *Nantejska* » est semblable aux variétés de la deuxième récolte de Montfavet. Toute interprétation supplémentaire sur cette confrontation variétale serait hasardeuse, compte tenu des difficultés d'échantillonnage et du manque de reproductibilité des conditions de déshydratation.

On peut essayer d'expliquer les remarques précédentes sur les relations entre flexion et perte d'eau. Le premier indice (FLEX. 1). exprime la turgescence et une certaine élasticité des tissus, le deuxième (FLEX. 2) est, au contraire, un critère de dégradation et de ramollissement. La limite imprécise de passage de l'un à l'autre a fait l'objet de travaux fondamentaux, pour une mise en formule de l'élasticité et de la plasticité des rondelles de carottes (Segerling, Snovar et Heldman, 1977). Pratiquement, ces critères ne peuvent être retenus qu'au niveau d'une sélection très avancée, plus particulièrement pour optimiser des conditions de culture ou de conservation.

*c*) Les mesures au pénétromètre manquent de sensibilité (tabl. 1 et 2) avec le dispositif expérimental utilisé; on n'a pas trouvé d'amélioration possible, car ce critère est une association de forces de cisaillement et de compression sur une surface nécessairement réduite.

L'intérêt de cet indice résiderait dans la différence entre le xylème et le phloème. Il y a une corrélation étroite entre les mesures de ceux-ci (tabl. 5, 6, 7); ceci en frais comme après déshydratation. Tous les résultats montrent une bonne homogénéité de texture pour les racines étudiées, même s'il se confirme généralement une plus grande dureté du cylindre central (cœur); la différence s'amplifie avec la déshydratation (tabl. 1 et 2), mais dans des limites trop étroites pour être révélatrices des caractéristiques variétales, si l'on ne veut pas augmenter considérablement l'échantillonnage.

A la première récolte seulement et sur l'ensemble des deux récoltes, quelques corrélations apparaissent entre les mesures au pénétromètre et les fibres brutes ou les matières insolubles dans l'alcool, ainsi qu'avec la diminution de jutosité; elles étaient attendues, mais la deuxième récolte ne les confirme pas. Par contre, les mesures sur le phloème (P. PH. 1) sont toujours liées avec l'indice réfractométrique ou matières sèches solubles.

En fait, la texture des racines, exprimée par des forces de résistance axiale, dans le sens des fibres, est fonction : d'une part, de l'ossature des tissus et des parois cellulaires, d'autre part, de l'état de turgescence ou viscoélasticité des cellules plus ou moins hydratées. Le cisaillement traduira mieux la charpente; les forces de compression et relaxation indiqueront les tensions internes et la cohésion des cellules. Des recherches dans ce sens ont été proposées par quelques spécialistes,

notamment par des mesures de « diffusion pressure déficit » et de pression osmotique (MACKEY, HARD et ZAEHRINGER, 1973; SZCZESNIAK, 1963, 1973). Ces méthodes présentent quelques difficultés pour leur application pratique, hors d'un laboratoire; ceci justifie le recours fréquent à des mesures sensorielles directes (BOURNE, 1975, 1977, SZCZESNIAK, 1977).

En définitive, la cassure, dans les conditions expérimentales décrites, s'avère un des meilleurs critères de texture pour la carotte. Elle est intéressante, non seulement par sa simplicité de mise en œuvre, sa sensibilité et sa précision relative, mais aussi par sa bonne représentativité des forces de résistance dues à la fibrosité et l'ossature tissulaire, ainsi que de la turgescence, de la richesse en eau et en constituants cellulaires. La mise au point d'un appareil portatif, utilisable au niveau du champ par les sélectionneurs, permet d'utiliser cette technique de mesure de la solidité des racines dès la récolte faite; ceci permettrait éventuellement d'adapter les modalités d'arrachage et de manipulations, pour le conditionnement vers la vente en frais ou vers la conservation.

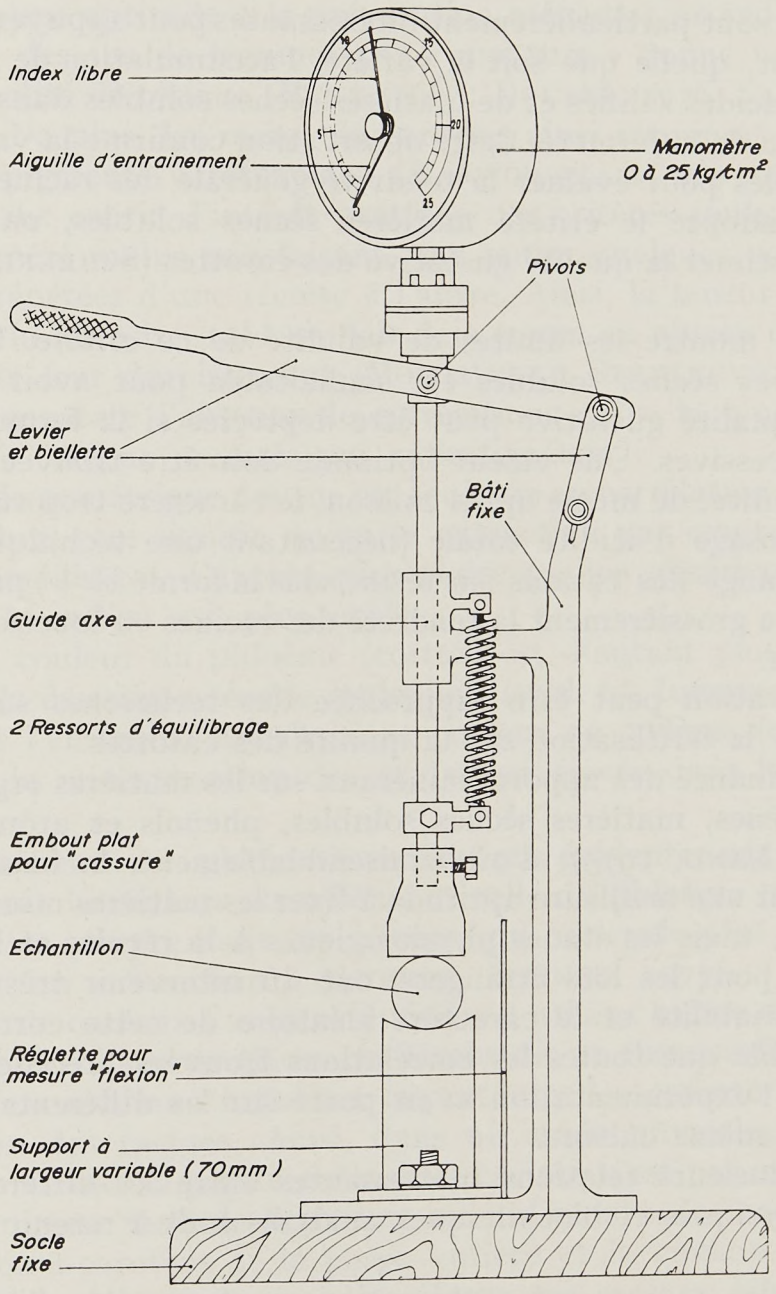



FIG. 2. — *Appareil portatif pour mesures de texture : cassure et flexion*

*2° Intérêt des critères de composition biochimique et physique*

Il y a des relations probables entre le poids moyen des lots de racines et leur développement, dont les indices de fibrosité analysés ou les critères de texture, mais sans tenir compte des différences variétales (tabl. 5 à 7).

Des corrélations significatives, mais aléatoires d'une récolte à l'autre, apparaissent entre plusieurs des critères physiques précédents et les indices de sucres ou d'acidité; on peut les interpréter très globalement.

Selon les conditions de croissance de chaque lot de carottes, le grossissement et le raffermissement des structures, indépendamment de la variété, sont accompagnés de l'accumulation de matières sèches solubles et notamment de saccharose; ceci est particulièrement vrai pour la première récolte (tabl. 5) et l'ensemble des deux (tabl. 7).

Dans la deuxième récolte (tabl. 6) et sur l'ensemble des deux (tabl. 7), il semble que l'acidité libre et surtout salifiée, traduise nettement mieux un vieillissement des racines. Les corrélations entre les acides salifiés (A.S.) avec les matières insolubles dans l'alcool (M.I.A.) et, à un degré moindre, l'acidité totale avec les sucres totaux, sont particulièrement intéressantes pour appuyer cette hypothèse.

Pratiquement, quelle que soit la variété, l'accumulation de sucres et surtout de saccharose, d'acides salifiés et de matières sèches solubles dans le jus traduirait une augmentation de la fermeté. Cette observation confirme la validité de critères analytiques simples pour évaluer la tendreté générale des racines. Des sélectionneurs ont déjà adopté le critère matières sèches solubles, ou indice réfractométrique, pour estimer la qualité gustative des carottes (Scheerens et Hosfield, 1976).

Notre étude montre les limites de validité de ce critère. Une teneur assez élevée en matières sèches solubles est souhaitable pour avoir suffisamment de sucres, mais la qualité gustative peut être dépréciée si la fermeté et surtout la fibrosité sont excessives. Une valeur optimale doit être trouvée pour ce légume consommé en crudité; de même après cuisson, le caractère trop sucré risque d'être un défaut. Le dosage d'acidité totale (nécessitant une technique acidimétrique simple après échange des cations sur résine sous la forme H +) peut être un indice usuel qui évaluera grossièrement la tendreté des racines en fonction de leur niveau de minéralisation.

Cette observation peut être rapprochée des recherches sur l'influence du type de sol et de la fertilisation sur la qualité des carottes.

Une prédominance des apports minéraux sur les matières organiques favorise les sucres, carotènes, matières sèches solubles, phénols et arômes (Chipman et Forsyth, 1971; Land, 1975); d'où, vraisemblablement, la fermeté des racines. Les variétés ayant une meilleure aptitude à fixer les matières minérales pourraient être plus fermes, mais les stades physiologiques à la récolte et les conditions de culture, surtout pour les lots étrangers, ont dû intervenir très sensiblement et augmenter la variabilité et le caractère aléatoire de cette corrélation.

Il est probable que toutes les corrélations trouvées précédemment auraient été meilleures si l'expérimentation avait porté sur les différents stades de développement d'une même culture.

Toutefois, plusieurs relations intéressantes entre les critères de texture et les caractères physiques et biochimiques analysés sont à retenir sur les tableaux de corrélations.

La cassure des racines est systématiquement corrélée (lignes horizontales des tabl. 5 à 7) au poids moyen, jutosité, fibres brutes, matières insolubles dans

l'alcool et de façon plus hasardeuse aux sucres et notamment avec le saccharose; ceci avant (cass. 1) ou après stockage des carottes (cass. 2).

Inversement (lignes verticales), la jutosité (ou aptitude à donner du jus par la technique utilisée) apparaît très liée, de façon significative et répétée, aux indices de résistance à la cassure, au cisaillement ou au pénétromètre. Ces coefficients de corrélation négatifs, sur l'ensemble des résultats, montrent que le critère jus est très représentatif de la tendreté des carottes, même après déshydratation.

Parallèlement, les fibres brutes, évaluées par la même technique, ont le même intérêt pour exprimer, d'une façon complémentaire, la fermeté.

Parallèlement, les coefficients de corrélation entre les matières insolubles dans l'alcool et la cassure ou le cisaillement sont relativement plus faible, chez la racine fraîche; mais les liens entre l'ossature des tissus (M.I.A.) et la solidité (cass. 2 et cis. 2) des racines s'améliorent avec la déshydratation des racines comme le montre la valeur des cœfficients (tabl 7).

Ces trois indices précédents (cassure, jus, fibres brutes) constituent des critères de sélection simples, accessibles par des laboratoires sommairement équipés. De plus, ces indices de tendreté (jus) ou de fermeté (fibres brutes) sont directement en relation avec une aptitude à la préparation ménagère ou industrielle.

L'obtention des jus de légumes par « mouture » donne un bon rendement et une bonne qualité diététique (Benk, 1963; Dousse, 1978; Saldana, Stephens et Lime, 1976). De plus, les marcs de carottes ainsi récupérés se prêtent bien à l'extraction de pigments caroténoïdes (Karwowska *et al.*, 1974).

Dans le même esprit, l'intérêt pratique des critères couleur et teneur en β carotène s'est avéré moins satisfaisant, car seules quelques corrélations significatives se sont répétées d'une récolte à l'autre. Ainsi, la teneur en β-carotène est en relation avec la fibrosité (tabl. 7), fait déjà connu au niveau du développement des racines et de leur durcissement (Mosorinski, Stefanovic et Grujicinjac, 1968). Mais on constate l'absence de corrélations entre la teneur en β-carotène et les indices de couleur mesurés par réflectométrie.

L'indice réflectométrique des jus est toujours en corrélation inverse (négative) avec l'acidité libre; ceci signifie qu'après extraction par mouture la couleur des jus pulpeux recueillis est d'autant plus claire (moins absorbante ou plus réfléchissante) que le milieu est plus acide.

De plus, la couleur du phloème (cortex) est d'autant plus claire que le pH est bas, mais à la deuxième récolte seulement (tabl. 6). Inversement, dans la première récolte et l'ensemble des deux, la couleur du xylème (cœur) est d'autant plus claire que la minéralisation des acides est élevée dans les racines (tabl. 5 et 7).

L'interprétation de ces phénomènes n'est pas évidente; néanmoins il demeure une tendance liant la couleur du xylème et celle du phloème (tabl. 6). Toutefois, il n'a pas été tenu compte dans ces mesures du péricycle plus clair qui apparaît très visiblement sur « Touchon » (Aubert, Bonnet, 1977).

Ces critères de couleur s'avèrent difficiles à utiliser même dans des protocoles expérimentaux plus élaborés (Kovacs, Horvath et Bencze-Bocs, 1976).

Notre étude confirme l'influence importante des caractéristiques variétales sur la coloration des racines. Ainsi, dans un stade physiologique relativement jeune (première récolte) la pigmentation des racines n'est pas un bon critère de la tendreté des carottes. Seule la deuxième récolte montre les corrélations existant entre la teneur en β-carotène de la pulpe entière et la cassure des racines avant comme après déshydratation.

De plus, sur les jus extraits, l'indice de réflectométrie (R. Jus) est en corré-

TABLEAU 6 : *Corrélations sur la deuxième récolte (plus « perfekcja »)*

| | P.M. | JUS | F.B. | M.I.A. | I.R. | S.T. | S.R. | S. | pH | A.L. | A.T. | A.S. | VIT. C | Carotène | R. Jus | R.XY. | R.PH. | CASS. 1 | FLEX. 1 | CIS. 1 | P.XY. 1 | P.PH. 1 | $H_2O$ | CASS. 2 | FLEX. 2 | CIS. 2 | P.XY. 2 | P.PH.2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Poids moyen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Jutosité | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fibre brute | * | ** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M. Ins. Alcool | | ** | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I. refracto | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sucres totaux | | | *** | ** | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sucres réducteurs | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Saccharose | | | | | | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH | * | ** | *** | *** | | ** | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidité libre | *** | ** | ** | ** | | * | | * | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidité totale | * | *** | *** | *** | | ** | | ** | *** | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidité salifiée | | *** | *** | *** | | ** | | * | ** | ** | *** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vitamine C | ** | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| β Carotène | ** | | * | | | | | | | * | * | * | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Réflect. jus | * | | | | | | | | | ** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Réflect. xylème | | | | | | | ** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Réflect. phloème | | * | | | | | ** | | ** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cassure 1 | *** | * | *** | *** | | ** | | * | *** | *** | *** | ** | * | *** | | | | | | | | | | | | | | |
| Flexion 1 | | | ** | ** | * | ** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cisaillement 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pénétr. xylème 1 | | | | | | | | | * | | | | | | | * | | | * | | P.XY. 1 | | | | | | |
| Pénétr. phloème 1 | | | | | ** | | | | * | | | | | | | | | | * | | *** | P.PH. 1 | | | | | | |
| Perte d'eau | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | $H_2O$ | | | | | |
| Cassure 2 | ** | ** | *** | *** | | ** | | | *** | *** | *** | ** | * | ** | * | | | *** | | * | | | | CASS. 2 | | | | |
| Flexion 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | * | | *** | ** | | | FLEX. 2 | | | |
| Cisaillement 2 | *** | * | *** | ** | | * | | * | ** | *** | *** | ** | | ** | ** | | | *** | | * | | | | *** | | CIS. 2 | | |
| Pénétr. xylème 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | * | | | P.XY. 2 | |
| Pénétr. phloème 2 | ** | | | | | | | | * | | | | * | * | | | | ** | | | | | | | | * | *** | P.PH.2 |

*Légende* :
Corrélations négatives ou inverses = le signe moins est placé sous le niveau de signification :

*** = très significatif (P supérieur ou égal à 0,01)
** = significatif (P entre 0,01 et 0,05)
* = probable ou possible (P entre 0,05 et 0,01)

TABLEAU 7 : *Corrélations sur ensemble des deux récoltes*

TABLEAU 7 : *Corrélations sur ensemble des deux récoltes*

| | P.M. | JUS | F.B. | M.I.A. | I.R. | S.T. | S.R. | S. | pH | A.L. | A.T. | A.S. | VIT. C | Carotène | R. Jus | R.XY. | R.PH. | CASS. 1 | FLEX. 1 | CIS. 1 | P.XY. 1 | P.PH. 1 | $H_2O$ | CASS. 2 | FLEX. 2 | CIS. 2 | P.XY. 2 | P.PH. 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Poids moyen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Jutosité | 570 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fibre brute | *593* | *812* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M. Ins. Alcool | 593 | *646* | *845* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I. refracto | | 496 | 523 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sucres totaux | 437 | | 509 | 606 | 564 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sucres réducteurs | | 483 | | | 425 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Saccharose | 643 | 663 | 623 | 473 | 752 | *697* | 624 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH | | | | 457 | | | 630 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidité libre | 672 | | 445 | 457 | 453 | 515 | 415 | *705* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidité totale | 429 | 466 | 479 | 668 | | 530 | | | 567 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidité salifiée | | | | 538 | | | | | 537 | | *969* | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vitamine C | | | | | 523 | | | | 563 | | | 421 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| β Carotène | 476 | | *615* | 537 | | | 536 | | | 459 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Réflect. jus | | | | | | | | 619 | | *723* | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Réflect. xylème | | | | | | | 431 | | | | 472 | 561 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Réflect. phloème | | 602 | 474 | | | | | | | | | | | | | 593 | | | | | | | | | | | | |
| Cassure 1 | 655 | *844* | *730* | *564* | 477 | | 517 | 663 | | | | | | | | 572 | | | | | | | | | | | | |
| Flexion 1 | | | | | | | 525 | | 459 | 426 | 640 | 728 | | | | | 549 | | | | | | | | | | | |
| Cisaillement 1 | 621 | 695 | 688 | 485 | 553 | | 691 | 686 | | 457 | | | | | | | | 859 | | | | | | | | | | |
| Pénétr. xylème 1 | | 664 | 550 | | 603 | | 453 | 452 | | | | | | | | | 513 | 663 | | 663 | | | | | | | | |
| Pénétr. phloème 1 | | 785 | 545 | | *704* | | 585 | 666 | 484 | | | | | | | | | 794 | | 741 | *874* | | | | | | | |
| Perte d'eau | | | | | 469 | | | 530 | | 451 | | | 632 | | | | | 418 | | 492 | | 419 | | | | | | |
| Cassure 2 | *828* | *769* | *803* | *794* | | 572 | | 709 | | 606 | 550 | | | | | 569 | | *845* | | *783* | 495 | 578 | | | | | | |
| Flexion 2 | | | | | | | | | | | | | 538 | | | | | | | | | | 680 | | | | | |
| Cisaillement 2 | *817* | *775* | *783* | *661* | 475 | 451 | 564 | 763 | | 621 | 445 | | | | | 447 | | *840* | | *839* | 580 | 638 | | *947* | | | | |
| Pénétr. xylème 2 | 443 | 741 | 712 | 506 | | | | | | | 443 | | | | | 566 | 431 | 711 | | 454 | 582 | 572 | | *594* | | 650 | | |
| Pénétr. phloème 2 | *672* | 592 | 763 | 603 | | | | | | | | | | 505 | | 503 | | *641* | | 501 | | | | 684 | | *692* | *829* | |

*Légende* : Coefficients de corrélation (× 1 000)
Corrélations négatives ou inverses = le signe moins est placé sous le niveau de signification :

*** = très significatif (P supérieur ou égal à 0,01 = 622)
** = significatif (P entre 0,01 et 0,05 = 574 à 497)
* = probable ou possible (P entre 0,05 et 0,10 = 497 à 426)
Corrélations retrouvées sur les tableaux 5, 6 et 7.

lation avec la couleur du xylème (R.XY.); c'est-à-dire la couleur des jus s'éclaircit alors que celle du cylindre central augmente, dans la première récolte fraîche seulement (tabl. 5).

De même, dans la deuxième récolte (tabl. 6), la couleur des jus frais est d'autant plus réfléchissante (plus claire) que la racine est résistante au cisaillement mesuré, mais après conservation seulement (CISS. 2); c'est-à-dire après perte de turgescence; la fraîcheur des racines serait donc favorable à la couleur du jus, les niveaux de cisaillement n'étant pas significativement touchés par la déshydratation, seule la turgescence intervient.

En fait, la mouture des racines, par une râpe circulaire, détache des particules d'autant moins fines que la racine est plus fibreuse et plus malléable en même temps, diminuant ainsi ce qui passe dans la fraction jus.

Pratiquement, pour obtenir un jus riche en carotène (Benk, 1963), compte tenu du caractère non hydrosoluble des caroténoïdes et d'un bon choix de variétés colorées, une bonne turgescence de racine est souhaitable; d'où la nécessité absolue d'une protection efficace contre la déshydratation, lors du stockage des carottes, pour éviter le ramollissement défavorable à la « mouture » utilisée. Cette technique peut éviter le recours fréquent à la « crémogénation », par broyage poussé des particules, afin d'obtenir des jus pulpeux mieux colorés (Gnaegi, Perraudin et Schopfer, 1977). Il y a intérêt à laisser quelques cellules intactes, pour limiter les phénomènes d'oxydation, ce qui est difficile à obtenir par les techniques par « pression », même après un blanchiment.

## Conclusion

Sur deux récoltes de variétés volontairement différenciées, c'est-à-dire dans une confrontation variétale aléatoire, on a pu mettre en évidence l'intérêt de critères simples de sélection, utilisables au niveau du champ ou dans des laboratoires sommairement équipés.

Dans les critères de texture, la cassure nécessite des précautions particulières d'échantillonnage, avec un classement par calibre et en fonction des caractères morphologiques d'une population de carottes. Cette réserve faite, cet indice de texture est commode à mettre en œuvre et fondamentalement valable pour exprimer la résistance mécanique et la turgescence des racines, en frais comme après une déshydratation par stockage. Les niveaux de cassure souhaitables pour la récolte, pour la consommation ou pour l'utilisation industrielle des diverses variétés à sélectionner restent à préciser.

Un avantage pratique de cette mesure est d'être relativement commode et utilisable en tous lieux après mise au point d'un appareillage rustique portatif.

Les mesures de cisaillement, de flexion ou au pénétromètre sont moins universelles et n'apportent pas d'informations plus précises sur la fermeté et l'état physiologique des racines.

Dans les caractéristiques morphologiques usuelles des cultivars, le poids moyen, constituerait un indice complémentaire de tri non destructif ayant une certaine valeur pour différencier, dans un calibre donné, les racines ayant une meilleure solidité et une aptitude à l'entreposage. Toutefois, il est probable que la longueur est aussi un facteur mécanique important dans la pratique.

Dans les critères biochimiques ou physiques comportant une analyse permettant d'éliminer la variabilité individuelle, après homogénéisation, deux indices simples peuvent suffire pour exprimer la qualité de texture des carottes.

L'aptitude à donner du jus et la teneur en fibres brutes (obtenues sur un même petit appareil ménager très courant) suffisent pour estimer la tendreté ou la fermeté des racines. Ces indices usuels ont fréquemment des corrélations significatives avec les autres critères de texture expérimentés et quelques autres constituants analysés, notamment la teneur en β-carotène. Ces critères sont aussi représentatifs des possibilités d'obtention industrielle, par mouture, de jus légèrement pulpeux ayant une bonne valeur alimentaire.

Par contre, dans notre contexte expérimental, des critères plus spécifiques comme l'indice réfractométrique (matières solubles), les sucres, les acides libres ou salifiés, la teneur en matières insolubles dans l'alcool (fibres et substances pecto-cellulosiques) ou divers indices de pigmentation ou de couleur « en l'état » des produits, sont moins satisfaisants pour le sélectionneur. Les corrélations que l'on pouvait attendre entre les critères physiques et la composition biochimique des carottes sont apparues très aléatoires, sur des récoltes et des variétés distinctes. Mais ils conservent leur valeur propre pour des sélections plus avancées sur des critères alimentaires ou organoleptiques précis.

*Reçu pour publication en décembre 1979.*

## Remerciements

Le service BIOMÉTRIE - S.T.E.F.C.E., de la Station de BIOCLIMATOLOGIE du Centre de Recherche d'Avignon, nous a aidé dans les calculs de corrélations effectués à l'aide d'un ordinateur MITRA 15-35. Nous tenons à remercier plus particulièrement M^me^ ARIES-DOSDA.

L'appareil portatif pour les mesures de cassure-flexion a été conçu et réalisé par M^r^ J. ARAKELIAN responsable de l'atelier mécanique de la Station de TECHNOLOGIE des PRODUITS VÉGÉTAUX. Ce prototype original ne peut être reproduit sans le concours des auteurs.

## Summary

*Texture and quality of carrot*

In the purpose to give for breeding usual quality criteria on the texture of carrots, correlations were researched between different indices of mecanical resistance and some biochemical characters (acidity, fibers, alcool insoluble substances, sugars, pigmentation, Vitamins A and C).

The break is a good measurement serviceable in all work conditions with a portable apparatus. This indice of firmness give good indications on importance of walls and turgor of root cells, in relation with deshydratation by storage. A flexibility indice is complementary, without bending with previous.

The sissoring measurement or puncture test are less interesting, in the same experimental conditions studied.

Two usuals analytical criteria, on juiciness and hard fibers are proposed, with avantage to simplify sample and population problems, when working with important lots of roots on all forms and varieties.

## Références bibliographiques

APELAND J., HOFTUN H., 1974. Effects of temperature— regime on carrot during storage. *Acta Horticulturae*, **38** (1), 291-308.

AUBERT S., BONNET A., 1977. Intérêt alimentaire des ombellifères. Exemple de la carotte (Daucus carota L.). Actes du 2^e^ Symposium International sur les Ombellifères : Contrib.

pluridisc. Syst., end 1977. Public 1978 : 809-821 (Fr.) Ed. CAUWETT M. et A. M., CARBONNIER J., Centre Univers. Perpignan (*in* C. A. 89 : 105950 a).

BALVOLL G., APELAND J., AURANAUNE J., 1976. Composition chimique et caractéristiques organoleptiques des carottes cultivées dans le sud et le nord de la Norvège. *Forskg Forsock Landbruk (Norge)*, **27** (4), 327-337.

BAUMANN H., 1974. Preservation of carrot quality under various storage conditions. *Acta Horticulturae*, **38** (1), 327-337.

BENK E., 1963. Sur la composition et l'expertise des jus de carottes (Alld). *Ind. Obst.-gemuse-verwertung*, **48** (6), 159-160.

BERNTSEN R., 1978. Lavage, classification et emballage des carottes. *Mild. Norges Landbrukgh Nonogsk (Norge)*, **57** (12), 1-20.

BIENZ D. R., 1965. Carrot splitting and second growth in central Washington as influenced by spacing-time of sidedressing and other cultural practices. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **86**, 406-410.

BIENZ D. R., 1968. Evidence for carrot splitting as an inherited tendency. *Proc. Amer. Soc. for. Hort. Sci.*, **93**, 429-433.

BONNET A., 1975. La culture d'hybrides de carottes en France. *Pépin. Horticult. Maraîchers*, **159** (8-9), 29-33.

BOURNE M. C., 1966. Measure of shear and compression components of puncture test. *J. Food Sci.*, **31**, 282.

BRADLEY G. A., DYCK R. L., 1968. Carrot color and carotenoids as affected by variety and growing conditions. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **93**, 402-447.

BRADLEY G. A., RHODES B. B., 1969. Carotenes, Xanthophylles and color in carrot varieties and lines as affected by growing temperatures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **94** (1), 63-65.

BURET Ph., 1976. Les premiers hybrides F1 répondant au marché français et européen. *Pépin. Horticult. Maraîchers*, **169** (8-9), 49-67.

CHIPMAN E. W., FORSYTH F. R., 1971. Characteristics of the epidermal layer of carrot root grown on peat and mineral soil. *Canadian J. of Plant Science*, **51** (6), 513-517.

CRIVELLI G., POLESSELO A., 1973. Research on quick-freezing of vegetables. III. Suitability of carrot varieties. *Freddo* (I.), **27** (3), 29-30 (*in* F.S.T.A. 75-04-J0608).

DERBYSHIRE D. M., CRISP A. F., 1978. Studies on treatment to prolong the storage life of carrots. *Exp. Hortc. (G. B.)*, **30**, 23-28 (*in* C. A. 89 : 161 658 y).

DICKSON M. H., 1966. The inheritance of longitudinal cracking in carrots. *Euphytica*, **15** (1), 99-101.

DORRELL D. G., CHUBEY B. B., 1972. Acceleration of enzymatic browning in carrot and parsnip roots by induced suberization. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, **97** (1), 110-111.

DOUSSE R., 1978. L'extraction solide-liquide dans l'industrie alimentaire. Application à la technologie des légumes. *Ind. Agric. Alim.*, **95** (12), 1341-1348.

FELDMAN A. L., GUSAR Z. D., POZNYAKOVA G. P., SOROKINA A. T., 1977. Storage of vegetables in a cold-storage chamber (Russ.). *Konservn Ovoshchesush Prom. St.*, **1**, 17-19 (*in* C.A. 86 : 104 611 s).

FIASSON J. L., ARPIN N., LEBRETON Ph., 1969. Sur l'analyse qualitative et quantitative des caroténoïdes naturels. *Chimie Analytique (Analusis)* (Fr.), **51** (5), 227-236.

FRITZ P. D., HABBEN J., 1973. Determination of ripeness of carrots. Ref. I.S.H.S. Symposium " Timing Field production of vegetables ", Ohrid, Yugoslavia. *Acta Horticulturae*, **52**, 231-238.

GNAEGI F., PERRAUDIN G., SHOPFER J. F., 1977. Conservation et qualité des carottes indigènes. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **9**, 173-177.

HANSEN H., RUMPF G., 1974. Storage of carrots (variety Nantaise). The influence of the storage atmosphere on flavour decay and content of sucrose, glucose and fructose. *Acta Horticulturae*, **38** (1), 321-326.

HARDH J. E., HARDH K., 1972. Effects of radiation, day-length and temperature on plant growth and quality : preliminary report. *Horticultural research*, **12** (1), 25-42.

HARDH J. E., 1975. The influence of the environnment of the nordic latitudes on the quality of vegetables (All[d]). *Qual. Plant.-Pl. Fds hum. Nutrit.*, **25** (1), 43-56.

HARDH K., HARDH J. E., 1977. Studies on quality of vegetables and strawberries at different latitude in Finland. *Ann. Agriculturae Fenniae*, **16** (1), 19-26.

HARDH J. E., PERSSON A. R., OTTOSSON L., 1977. Quality of vegetables cultivated at different latitudes in Scandinavia. *Acta agriculturae Scandinavica*, **27** (2), 81-96.

HOWARD P. L., HEINZ D. E., 1970. Texture of carrots. *J. Texture Studies*, **1**, 185-195.

KAPSALIS J. G., SEGARS R. A., KRIZIK J. G., 1972. An instrument for measuring rheological properties by bending. Application to food material of plant origin. *J. Texture Studies*, **3** (1), 31-50.

KARWOWSKA K., KUSZLIK J., KRAJEWSKA K., GEGA Z., 1974. Études sur la nouvelle technologie de production de caroténoïdes (Pol.) *Prace Instytutow i Lab. Bad. Przem. spoz.*, **24** (1), 19-29 (Instytut przemyslu fermentacyjnego, Warszawa).

KOVACS E., HORVATH L. J., BENCZE-BOCS J., 1978. Sensory and instrumental measurement of colour changes occuring during storage in some carrot varieties. *Acta Alimentaria (Hung.)*, **7** (2), 103-110.

KOVACS E., VOEROES Z., 1976. A study into the keeping quality of carrot varieties. *Acta Alimentaria* (Hung.), **5** (4), 335-350.

KRAUT C. W., 1974. A study of the nutritional composition of selected carrot varieties. *Dissert. Abstr. Int.*, **35** (6), 2808 B, 2809 B.

KRUG H., BAUR R., 1973. Wound healing in carrots (*Daucus carota* L.). Preliminary results. *Gartenbauwissenschaft*, **38** (5), 447-451.

LANE R. P., PETERSON C. E., ELLIOTT F. C., 1969. Feasibility of using the meadow vole, microtus pennsylvanicus, to bioasay the nutritive value and culinary quality of some carrot inbred lines and hybrids. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, **94** (2), 96-98.

LAND D. G., 1975. Carrot flavour and the factors which influence it. *J. Sci. Food Agric.*, **26** (10), 1610-1616.

MACKEY A. C., HARD M. M., ZAEHRINGER M. V., 1973. Measuring textural characteristics of fresh fruit and vegetables. Apples, carrots and cantaloupes (A. manual of selected procedures). Technical bull. 123. Agricultural Experiment Station. Oregon State University. Corvallis (Or.).

MARKO N., 1972. Carrot as potential raw materials for dietetic foods (Yug.) *Hrana i Ishrana*, **13** (9/10), 436-442 (*in* F.S.T.A. 74-07-G0450).

MATTHEE V., APPLEDORF H., 1978. Effect of cooking on vegetable fiber. *J. Food Sci.*, **43**, 1344-1345.

MICHALIK H., BAKOWSKI J., 1977. Content and distribution of carotenoid in carrot in relation to the harwest time. *Bull. warzywniczy (Pol.)*, **20**, 417-425 (*in* C.A. 89 : 213802 n).

MOSORINSKI N., STEFANOVIC D., GRUJICINJAC B., 1968. Changes in the content of carotene and other substances in carrot roots during growth (Serbo-croat + Eng. Summary). *Zborn. Rad. poljopriv. Fac. Beograd*, **16** (481), 1-7 (*in* Hort. Abst. n° 4153, **40**, 504-5).

PESKOV V. A., DUDKIN M. A., 1973. Characteristic of carbohydrates in carrots and their changes during storage. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zanedenij, Pishchevaya tekhnologia*, **2**, 29-31 (*in* F.S.T.A. 74-04-JO 456).

PHAN C. T., HSU H., 1973. Physical and chemical changes occuring in the carrot root during growth. *Canadian Journal of plant science*, **53** (3), 629-634.

PHAN C. T., HSU H., SARKAR S. K., 1973. Physical and chemical changes occuring in the carrot root during storage. *Canadian J. of plant science*, **53** (3), 635-641.

PHAN C. T., 1974*a*. Biochemical studies on the development of bitterness in stored carrots. *Acta Horticulturae*, **38** (1), 309-319.

PHAN C. T., 1974*b*. Use of plastic films in the storage of carrots. *Acta Horticulturae*, **38** (1), 345-350.

SALDANA G., STEPHENS T. S. and LIME B. J., 1976. Carrot beverages. *J. Food Sci. (U.S.A.)*, **41** (5), 1243-1244.

SCHEERENS J. C., HOSFIELD G. L., 1976. The feasibility of improving eating quality of table carrots by selecting for total soluble solids. *J. Amer. Soc. Hort· Sci.*, **101** (6), 705-709.

SCHONEVELD J. A., 1973. Effect of handling method on quality of washed carrots. *Bedryfsontwikkeling* (Neth.), **4** (1), 99-104 (*in* F.S.T.A. 73-11-J. 1829).

SCHUTZ H. G., DAMRELL J. D., LOCKE D. H., 1972. Predicting hedonic ratings of raw carrot texture by sensory analysis. *J. Texture Studies*, **3** (2), 227-232.

SCHWARZ A., 1977. Conservation de carottes : relation possible entre la conservabilité et les conditions du champ. *Acta Horticulturae*, **62**, 345-350.

SEGERLIND L. J., SNOVAR B. A., HELDMAN D. R., 1977. Compression and relaxation properties of carrots. *J. Texture Stud. (Netherl.)*, **7** (4), 451-456.

SNOBAR B. A., 1974. Engineering parameters related to the hardness of carrots. *Dissert. Abstr. Intern.*, B, **34** (12), 5962 : order n° 74-13977.

SOUTHGATE D. A. T., HUDSON G. J., ENGLYST H., 1978. The analysis of dietary fibre. The choice for the analyst. *J. Agric. Fd. Agric.*, **29** (11), 978-988.

Szczesniak A. S., 1963. Classification of textural characteristics. *J. Food. Sci.*, **28**, 385-399; 397-403; 404-409 et 410-420.

Szczesniak A. S., 1977. Rheological problems in the food industry. *J. of texture studies*, **8** (3), 119-133.

Szczesniak A. S., 1973. Instrumental methods of texture measurements. In " Texture Measurement of foods ", A. Kramer and A. S. Szczesniak Eds., D. Reidel, Publishing Co.

Thorne S., 1972. Behaviour of stored carrot; their inversion by rhizopus stolonifer lind. *J. Food Technol. (G. B.)*, **7** (2), 139-151.

Tressler D. K., Joslyn M. A., 1961. Fruit and vegetables juice processing technology. Wesport: the Avi publishing company.

Toul V., 1974. Influence of the location on the β-carotene content in carrots (Tch. + Eng. *Summary*). *Bull. Vyzk Ust. Zelin. Olonouc*, **18**, 49-60.

Van den Berg L., Lentz C. P., 1966. Effect of temperature, relative humidity and atmospheric composition on change in quality of carrots during storage. *Food. Techn.*, **20**, 954-957.

Vecher A. S., Pushkina G. I., Reshetnikov V. N., 1978. Effectiveness of saving carrots for industrial uses. *Vestsi Akad Nauk USSR, Ser. Sel'skagaspad Naruk*, **3**, 84-88 (Bieloruss.) (*in* C.A. 89 : 213803 p).

Volking I. L., Lobanova A. S., 1972. Influence of relative air humidity in potato and vegetable store-rooms on the intact state of the produce (Russ.). *Konservnaya I Ovoshchesushil'naya promysklennost*, **27** (6), 9-11 (*in* F.S.T.A. 73-04-J0492).

Weichman J., 1973*a*. Quality of carrots stored in substitution controlled atmosphere. *Gartenbauwissenschaft*, **38** (1), 75-84.

Weichman J., 1973*b*. Effect of different $CO_2$ partial pressures on the respiration of carrots (*Daucus carota* L.). *Gartenbauwissenschaft*, **38** (3), 243-252.

Weichman J., Ammerseder E., 1974. Influence of C.A. storage conditions on carbohydrate change in carrot. *Acta Horticulturae*, **38** (1), 339-344.

Weichman J., Kaeppel R., 1977. Harvesting dates and storage-ability of carrots (*Daucus Carota* L.). *Acta Horticulturae*, **62**, 191-196.

Wolford E. R., Nelson J. W., 1971. Comparison of texture of carrot frozen by airblast, food freezant — 12, nitrogen vapour. *J. Food Sci.*, **36** (6), 959-961.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (4), 423-431.

# Influence du chauffage sur la fixation du nitrite à la myoglobine

M. RENERRE, P. ROUGIE

avec la Collaboration technique : R. LABAS

*Station de Recherches sur la Viande, C.R.Z.V., I.N.R.A.*
*Centre de Recherches de Clermont-Ferrand*
*Theix, 63110 Beaumont*

## Résumé

Cette étude a consisté à apprécier l'influence du chauffage sur la quantité d'oxyde nitrique fixée sur le pigment purifié de muscle de bovin afin de mieux comprendre les phénomènes qui régissent la stabilité de la couleur des produits charcutiers. La nitrosation de la myoglobine a nécessité l'emploi de nitrite de sodium marqué avec de l'azote 15.

Si l'on compare le nitrosopigment non chauffé à celui chauffé à 100 °C le nombre de moles d'oxyde nitrique fixées par mole de pigment double.

A la température de 72 °C, l'augmentation du temps de chauffage favorise la fixation d'oxyde nitrique sur le pigment et accroît la proportion d'hème di-nitrosé.

L'augmentation du temps ou de la température de chauffage entraîne la précipitation croissante de la fraction globinique de la protéine et favorise la fixation concomitante d'oxyde nitrique sur le pigment. Ce phénomène expliquerait, pour une part, la meilleure stabilité de la couleur des produits saumurés cuits par rapport aux produits saumurés crus.

Mots clés : *nitrite, myoglobine, nitrosomyoglobine, chauffage*

## I. — Introduction

Dans les produits de charcuterie, le nitrite est utilisé pour son pouvoir bactériostatique, son action sur la couleur et sur la flaveur des produits. Une partie du nitrite ajouté se retrouve sous forme libre tandis que l'autre partie est, soit liée aux composants de la viande, comme la myoglobine, soit détruite au cours du traitement.

HALDANE, en 1901, découvrit que la couleur rose caractéristique des produits de salaison était due à la fixation d'oxyde nitrique sur le pigment. Un demi-siècle plus tard, HORNSEY (1956) mettait au point les méthodes d'extraction et de dosage

du nitrosopigment. S'il est bien admis aujourd'hui que la formation du nitrosopigment nécessite la réduction préalable du nitrite, par contre, le mécanisme de cette réaction n'est pas encore parfaitement élucidé. Trois explications sont actuellement proposées.

La première (Fox et Ackermann, 1968) fait appel à une réduction chimique, la deuxième (Walters *et al.*, 1967) fait intervenir certaines enzymes de la mitochondrie ou de la voie glycolytique (Cheah, 1976) et enfin, l'hypothèse de Koizumi et Brown (1971) fait appel à un mécanisme biochimique non enzymatique. Ces mécanismes ont été décrits *in vitro* et on ignore actuellement (Giddings, 1977) si un mécanisme similaire se réalise dans le développement de la couleur de la viande saumurée.

On ne sait toujours pas, non plus, quelles sont les transformations exactes subies par le pigment au cours de la cuisson et quelles en sont les conséquences sur la stabilité de la couleur des produits charcutiers. Les premiers travaux d'identification du pigment responsable de la couleur de la viande saumurée crue et cuite datent de 1962 où Tarladgis, à la suite de mesures en R.P.E.(*) en particulier, émet l'hypothèse que le pigment de la viande saumurée cuite est un dinitrosylhémochrome. Cependant Fox (1966) ainsi que Francis et Clydesdale (1971) émettent des réserves sur l'identité du pigment de la viande saumurée cuite telle qu'elle est rapportée par Tarladgis. Ces auteurs pensent plutôt qu'il existe un complexe nitrosylhémochrome-globine dénaturée. Actuellement, seule l'équipe de Lee et Cassens (1976) aux États-Unis a réalisé un travail visant à répondre à cette question.

Notre travail avait pour but de vérifier quelle était, d'une part, la quantité d'oxyde nitrique fixée sur le pigment à température ambiante et quelles étaient, d'autre part, les modifications induites par un chauffage du nitrosopigment en présence de nitrite, à différentes températures.

## II. — Matériel et méthodes

En raison des difficultés de dosage de l'oxyde nitrique fixé sur le pigment par les méthodes classiques, nous avons utilisé du nitrite de sodium marqué avec de l'azote 15 (Laboratoire Prochem, 94,55 p. 100 d'enrichissement).

La myoglobine utilisée a été extraite à partir de m. Diaphrama de taurillon. Elle a été purifiée selon la méthode décrite par Renerre (1977).

### 2.1. — *Nitrosation de la myoglobine*

Après purification, la myoglobine est dialysée pendant 15 h contre du tampon phosphate disodique-acide citrique pH 5.2, 76 mM. La nitrosation du pigment est ensuite réalisée par additions d'ascorbate de sodium et de nitrite de sodium dans un rapport de 100 moles pour 1 mole de myoglobine. La nitrosation se fait à 22 °C, sous agitation et à l'obscurité. Elle est suivie en spectrophotométrie par l'évolution de la densité optique au maximum d'absorption de la nitrosomyoglobine à 545 nm (Lee et Cassens, 1976).

Pour étudier l'influence des conditions de chauffage sur le comportement du nitrosopigment, nous avons retenu trois températures :

(*) Résonance paramagnétique de l'électron.

22 °C : température ambiante

72 °C : température de cuisson de nombreux produits saumurés qui est également une température critique pour la stabilité du nitrosopigment

100 °C : température entraînant la dénaturation totale de la protéine.

### 2.2. — *Préparation de la nitrosomyoglobine à température ambiante*

Un volume d'environ 12 ml contenant 40 mg de nitrosopigment est déposé sur une colonne de Sephadex G. 25 ($\phi$ 2,5 cm × H 50 cm) afin d'éliminer le « nitrite libre » qui ne s'est pas fixé sur la myoglobine. Le tampon d'élution (phosphate disodique + acide citrique 76 mM pH 5,2) contient de l'ascorbate de sodium à raison de 25 m.moles par litre dans le but de maintenir la nitrosomyoglobine dans un milieu réducteur.

### 2.3. — *Chauffage de la nitrosomyoglobine*

#### 2.31. — *Chauffage à 72 °C*

Des échantillons identiques de nitrosopigment sont déposés dans des tubes en verre hermétiquement clos et sont mis à chauffer pendant 12 min dans un bloc électrique préréglé à la température de 72 °C. Après refroidissement, les échantillons sont filtrés et le filtrat est passé sur colonne de Sephadex G25, élué par le tampon d'élution utilisé précédemment, et est analysé.

De la même façon, des échantillons sont mis à chauffer pendant une heure à 72 °C. Une fois refroidis, on ajoute 0,25 m.moles d'ascorbate de sodium, afin de maintenir des conditions réductrices et on laisse incuber pendant 2 h à température ambiante. Les échantillons sont filtrés et le précipité est rincé abondamment par le tampon d'élution contenant de l'ascorbate afin d'éliminer le « nitrite libre ». Le filtrat est passé sur colonne de Sephadex G25.

#### 2.32. — *Chauffage à 100 °C pendant une demi-heure*

Des tubes fermés contenant le nitrosopigment sont mis à chauffer dans un bain d'eau bouillante pendant une demi-heure. Après addition d'ascorbate de sodium dans les tubes, le précipité seul est analysé après avoir été lavé abondamment dans les mêmes conditions que celles rapportées ci-dessus.

### 2.4. — *Dosage de l'azote total*

La méthode de KJELDAHL n'est pas directement utilisable pour doser l'azote si celui-ci est lié à un oxygène. Pour cette raison nous avons choisi la méthode d'OLSEN modifiée mise au point par BREMNER et SHAW (1958). Les échantillons sont soumis à une oxydation en milieu acide (4 ml de $KMNO_4$ 5 p. 100 + 5 ml d'$H_2SO_4$ 18 N), suivie d'une réduction par le fer ferreux (1 g) puis chauffés une heure à 100 °C. Après refroidissement, les échantillons sont minéralisés pendant 48 h après addition de 100 mg environ de sélénite de sodium, de pierre ponce et de 3 ml d'$H_2SO_4$ (36 N). Le sulfate d'ammonium obtenu est distillé après addition de soude 7,5 N. Le distillat est recueilli dans de l'acide sulfurique 0,6 N. L'azote total est dosé sur une chaîne automatique Technicon.

### 2.5. — *Dosage du $^{15}N$*

La détermination du rapport $^{15}N/^{14}N$ est faite par spectrométrie de masse à l'aide d'un appareil Varian GL 50 au service de radioagronomie du CEA à Cadarache. Par comparaison de l'enrichissement de nos échantillons à la teneur naturelle, on peut faire la part de l'azote provenant du nitrite dans le minéralisat.

### 2.6. — *Méthodes statistiques*

Les différences de moyenne sont testées à l'aide de la méthode du test « *t* » de STUDENT.

## III. — Résultats et discussion

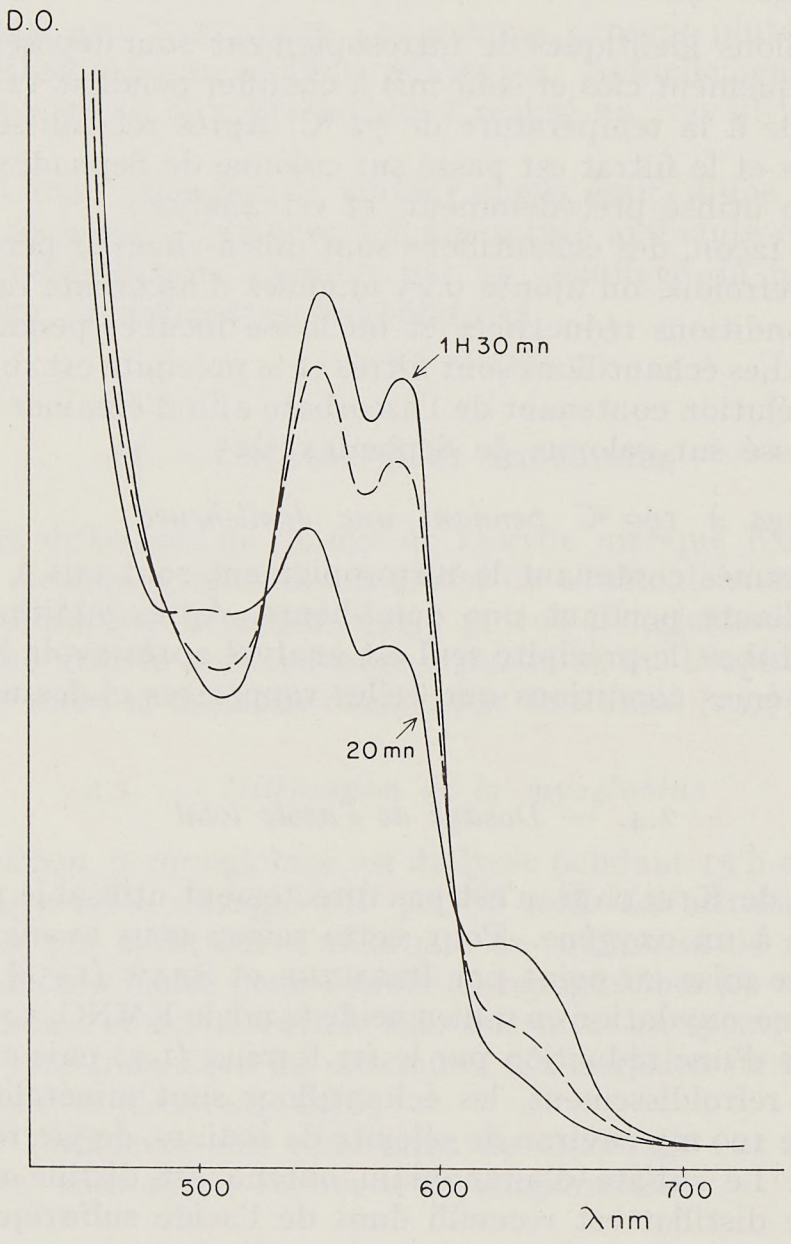



FIG. 1. — *Nitrosation de la myoglobine*

### 3.1. — *Obtention du pigment nitrosé*

Afin d'obtenir de la nitrosomyoglobine de couleur rouge, qui reste stable à l'air, et d'éviter la formation de pigment de couleur brune, il est nécessaire de se mettre dans des conditions réductrices (WALTERS *et al.*, 1967). Pour cela nous utilisons l'ascorbate de sodium, plus efficace que d'autres réducteurs comme les quinones ou la cystéine (FOX et THOMSON, 1963). Les concentrations élevées en ascorbate et en nitrite de sodium, vis-à-vis du pigment, permettent d'avoir une nitrosation rapide et complète. Le milieu réactionnel est tamponné à un pH de 5,2 car les pH acides facilitent la réaction de nitrosation (FOX et THOMSON, 1963). PAUL

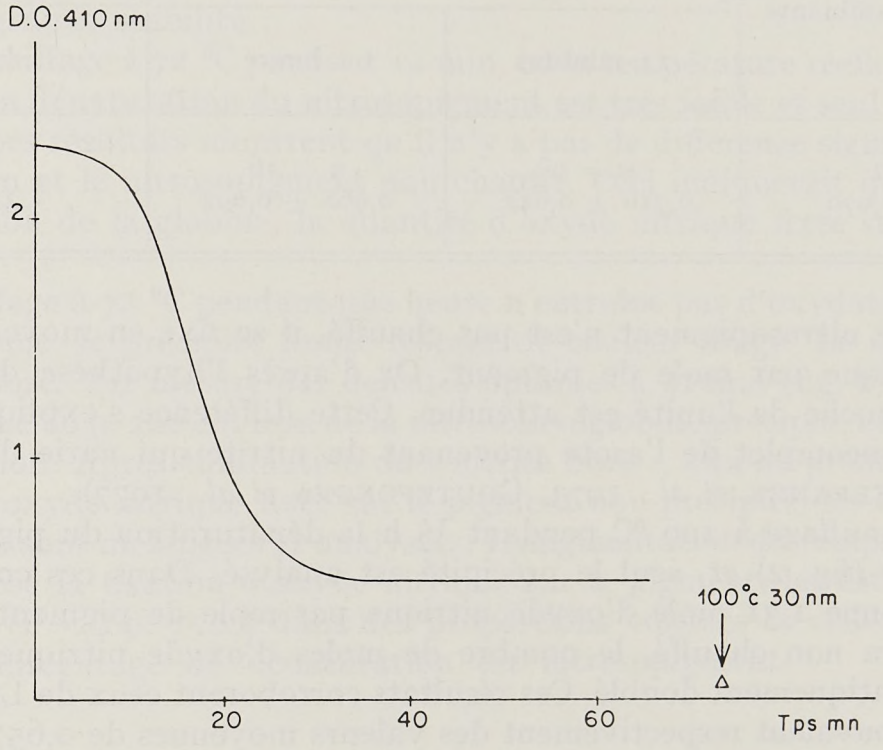



FIG. 2. — *Dénaturation thermique d'une solution de nitrosomyoglobine à 72 °C (pH 5,2, 4.10⁻⁵M) mesurée à la longueur d'onde de 410 nm.*

et KUMTA (1975) en utilisant des concentrations de réducteur et de nitrite 10 fois supérieures aux nôtres, montrent que la nitrosation conduisant à la nitrosomyoglobine de couleur rouge se réalisait pour un pH de 5,5.

La nitrosation se fait à l'obscurité (FOX, 1968) en 1 h 30 min environ comme le montre la figure 1. Le pigment formé passe par une forme intermédiaire de couleur brune qui, pour FROUIN *et al.* (1976), serait la nitrosométmyoglobine. Si on compare le cœfficient d'extinction molaire, à 545 nm, de la nitrosomyoglobine ainsi préparée, à celui rapporté par ANTONINI et BRUNORI (1971) on estime qu'il y a 97 p. 100 de nitrosopigment formé durant l'incubation.

Par mesure de la densité optique à 410 nm (Bande de SORET) nous avons suivi la dénaturation thermique d'une solution de nitrosomyoglobine à pH 5,2, chauffée à 72 °C pendant un temps variable (fig. 2). Afin de nous placer dans des conditions où la dénaturation du nitrosopigment est soit très faible soit maximum nous avons retenu 12 min et 60 min comme temps de chauffage.

### 3.2. — *Détermination de la quantité de nitrite lié au pigment dans les différents échantillons*

Le dosage de l'azote lourd permet de déterminer le nombre de moles d'oxyde nitrique fixées par mole de myoglobine. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I :

TABLEAU I

*Nombre de moles d'oxyde nitrique fixées par mole de myoglobine*
$n$ = nombre d'échantillons

| Température ambiante | Chauffage à 72 °C | | Chauffage à 100 °C |
|---|---|---|---|
| | 12 minutes | 1 heure | 1/2 heure |
| $n = 12$<br>0,735 ± 0,070 | $n = 9$<br>0,716 ± 0,042 | $n = 18$<br>0,968 ± 0,092 | $n = 8$<br>1,31 ± 0,219 |

Quand le nitrosopigment n'est pas chauffé, il se fixe en moyenne 0,74 mole d'oxyde nitrique par mole de pigment. Or d'après l'hypothèse de TARLADGIS, une valeur proche de l'unité est attendue. Cette différence s'explique par un recouvrement incomplet de l'azote provenant du nitrite qui varie de 65 p. 100 à 85 p. 100 (SEBRANEK *et al.*, 1973, GOUTEFONGEA *et al.*, 1977).

Après chauffage à 100 °C pendant ½ h la dénaturation du pigment est quasiment totale (fig. 2) et, seul le précipité est analysé. Dans ces conditions, il se fixe en moyenne 1,31 mole d'oxyde nitrique par mole de pigment. Par rapport à l'échantillon non chauffé, le nombre de moles d'oxyde nitrique fixées sur le pigment a pratiquement doublé. Ces résultats corroborent ceux de LEE et CASSENS (1976) qui trouvaient respectivement des valeurs moyennes de 0,657 mole et 1,31 mole d'oxyde nitrique fixées par mole de myoglobine.

Ces résultats tendraient à confirmer l'hypothèse de TARLADGIS (1962) selon laquelle, du fait de la rupture de la liaison hème-globine, le pigment de la viande saumurée cuite présenterait deux sites de coordination axiale pour l'oxyde nitrique tandis que la viande saumurée crue n'en présenterait qu'un seul. Cette hypothèse est, en outre, appuyée par des résultats récents : d'une part, MAXWELL et GAUGHEY (1976) proposent pour le pigment nitrosé non chauffé la structure rapportée dans la figure 3 et, d'autre part, WAYLAND et OLSON (1974) montrent

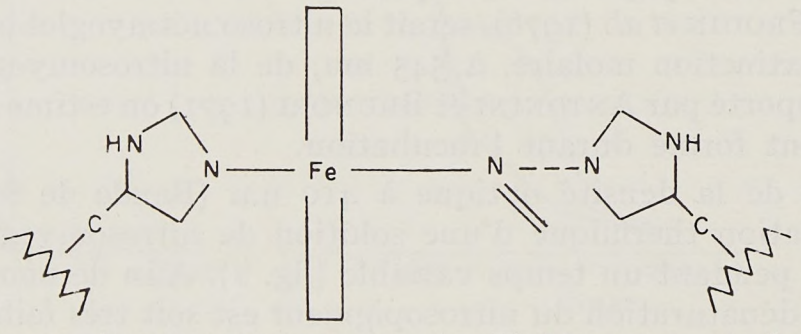



FIG. 3. — *Structure du nitrosopigment non chauffé* (MAXWELL et CAUGHEY, 1976).

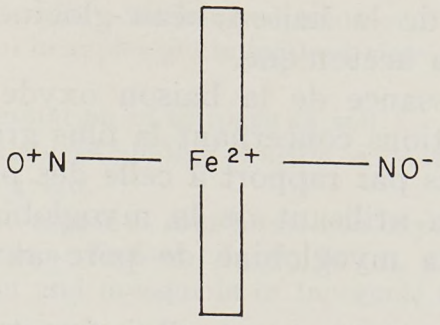



FIG. 4. — *Noyau tétrapyrollique di-nitrosé* (WAYLAND et OLSON, 1974).

l'existence possible d'un noyau tétrapyrollique di-nitrosé (fig. 4). RIFKIND (1973) avait montré l'existence d'un complexe similaire où une base azotée était en position trans par rapport à une molécule d'oxyde nitrique, ce qui conférait au produit une grande stabilité.

Après chauffage à 72 °C pendant 12 min, où la température réellement atteinte est de 70 °C, la dénaturation du nitrosopigment est très faible et seul le surnageant est analysé. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre cet échantillon et le nitrosopigment non chauffé. Ceci indiquerait qu'en l'absence de dénaturation de la globine, la quantité d'oxyde nitrique fixée sur l'hème n'évolue pas.

Le chauffage à 72 °C pendant une heure n'entraîne pas d'oxydation de l'atome de fer de l'hème, le précipité formé restant de couleur rouge. Le surnageant est également coloré. Par mesure des densités optiques à 410nm (fig. 2) et à 280 nm, on constate que 80 p. 100 environ de la nitrosomyoglobine précipite et que 20 p. 100 reste en solution. Après élimination du « nitrite libre », afin de prendre en compte la quantité d'oxyde nitrique fixée sur le pigment non précipité, les deux fractions ainsi obtenues sont mélangées et analysées. L'augmentation du temps de chauffage à 72 °C favorise la fixation d'oxyde nitrique sur le pigment, les différences étant significatives ($P < 1$ p. 1000) dans des proportions voisines de celles de l'augmentation du pourcentage de dénaturation du nitrosopigment.

## Conclusion

Si l'on compare le nitrosopigment non chauffé à celui chauffé à 100 °C, le nombre de moles d'oxyde nitrique fixées par mole de pigment double. Ce résultat confirmerait l'hypothèse de TARLADGIS selon laquelle le pigment de la viande saumurée cuite obtenue par extraction acétonique serait un dinitrosylhémochrome. La possibilité de fixation d'oxyde nitrique au niveau de la globine dénaturée par la chaleur n'est cependant pas exclue.

Un chauffage à 72 °C pendant un temps court n'entraîne pas de dénaturation importante du nitrosopigment et, de ce fait, la quantité d'oxyde nitrique fixée sur l'hème est identique à celle rencontrée dans nos échantillons non chauffés. L'augmentation du temps de chauffage à 72 °C ainsi que celle de la température de chauffage jusqu'à 100 °C entraîne une dénaturation croissante du nitrosopigment. Ce phénomène s'accompagnerait de ruptures de plus en plus nombreuses de la liaison hème — globine et favoriserait ainsi la formation d'hème di-nitrosé. La fixation d'une mole d'oxyde nitrique sur le pigment cru s'accompagnerait

déjà d'un affaiblissement de la liaison hème-globine du fait de l'obtention du nitrosohème par extraction acétonique.

Une meilleure connaissance de la liaison oxyde nitrique-pigment pourrait nous apporter des informations concernant la plus grande stabilité de la couleur des produits saumurés cuits par rapport à celle des produits saumurés crus.

Ce travail, effectué en utilisant de la myoglobine de bœuf, pourrait être complété par l'étude de la myoglobine de porc aux caractéristiques physico-chimiques différentes.

*Reçu pour publication en décembre 1979*

## Summary

*Influence of heating on the nitrite fixation on myoglobin*

This study cousisted in assessing the effect of heating upon the quantity of nitric oxide fixed on the purified pigment of bovine muscle so as to better understand the phenomena which govern the colour stability of pork meat products.

Nitrosation of the myoglobin required the use of sodium nitrite marked with nitrogen 15.

0.74 mole of nitric oxide per mole of pigment was fixed on the raw pigment. After heating at 100 °C for half an hour the number of moles nitric oxide fixed on the pigment had practically doubled (1.31 moles). Heating at 72 °C for 60 mn promoted the fixation of nitric oxide on the pigment at the same time as the coagulation of the globin.

The increase in time or temperature of heating brought about the rising precipitation of the globinic fraction of the protein and promoted the concomitant fixation of nitric oxide on the pigment. This phenomenon would partly explain the best colour stability of the cooked transformed products compared with raw transformed products.

## Références bibliographiques

ANTONINI E., BRUNORI M., 1971. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. *North Holland Publi. Comp.*, p. 19.

BREMNER J. M., SHAW K., 1958. Denitrification in soil. *J. Agr. Sci.*, **51**, 22-39.

CHEAH K. S., 1976. Formation of nitrosylmyoglobin in bacon involving lactate deshydrogenase. *J. Food. Technol.*, **11**, 181-188.

FOX J. B., THOMSON J., 1963. Formation of bovine nitrosomyoglobin. *J. Biochemistry*, **2**, 465-470.

FOX J. B., Jr, 1966. The chemistry of meat pigments. *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 207-210.

FOX J. B., Jr, ACKERMAN S. A., 1968. Formation of nitric oxide myoglobin: mecanisms of the reaction with various reductants. *J. Food Sci.*, **33**, 364-370.

FRANCIS F. J., CLYDESDALE F. M., 1975. Food colorimetry theory and application. Avi, Westport, Conn.

FROUIN A., CORDIER J. P., THENOT M., BAZILE J., JONDEAU D., 1976. Structure des pigments nitroso des viandes. *Ann. Nutr. Alim.*, **30**, 767-771.

GIDDINGS G. G., 1977. The basis of color in muscle foods. *C.R.C. Food Sci. and Nutrit.*, 9 (n° 1).

GOUTEFONGEA R., CASSENS R. G., WOOLFORD G., 1977. Distribution of sodium nitrite in adipose tissue during curing. *J. Food Sci.*, **42** (6), 1637-1641.

HORNSEY H. C., 1956. The color of cooked cured porc. 1. — Estimation of the nitric oxide haem pigments. *J. Sci. Food Agric.*, **7**, 354-359.

KOIZUMI C., BROWN W. D., 1971. Formation of nitric oxide myoglobin by nicotinamide adenine dinucleotides and flavins. *J. Food Sci.*, **36**, 1105.

HALDANE J., 1901. The red color of salted meat. *J. Hygiene*, **1**, 185.

LEE S. H., CASSENS R. G., 1976. Nitrite binding sites of myoglobin. *J. Food Sci.*, **41**, 969-970.

MAXWELL J. C., CAUGHEY W. S., 1976. An infrared study of NO bonding to heme B and hemoglobin A. Evidence for inositol hexaphosphate induced cleavage of proximal histidine to iron bonds. *Biochem.*, **15**, 388.

OLSEN C., 1929. On the determination of nitrogen in soil. *C. R. Lab. Carlsberg*, **17**, n° 3.

PAUL P., KUMTA U. S., 1975. Reduced binding of nitric oxide in irradied horse heart myoglobin. *J. Agr. Food Chem.*, **23** (1), 37-40.

RENERRE M., 1977. Purification rapide et sous forme non oxydée de la myoglobine des viandes de bovins, ovins et porcins. *Ann. Technol. Agric.*, **26** (4), 419-433.

RIFKIND M., 1973. Hemoglobin and myoglobin in Inorganic Chemistry, Vol. 2, Eichhorn, G, Ed Elsevier, Amsterdam.

SEBRANEK J. G., CASSENS R. G., HOEKSTRA W. G., 1973. P. of I. Sym. on $NO_2$ in Meat Products. *Zeist. the Neterlands*, 139-148.

TARLADGIS B. G., 1962. Interpretation of the spectra of meat pigments. II cured meats, the mechanism of color fading. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 485-491.

WALTERS C. L., CASSELDEN R. J., McM TAYLOR A., 1967. Nitrite metabolism by skeletal muscle mitochondria in relation to haem pigments. *Biochom. Biophys. Acta*, **143**, 310-318.

WAYLAND B. B., OLSON L. W., 1974. Spectroscopic studies and bonding model for nitric oxide complexes of iron porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 6037-6042.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (4), 433-444.

# Taux de glycogène musculaire, stress de transport et pH ultime de la viande chez le mouton

P. GIRE, G. MONIN

avec la collaboration technique de A. TALMANT et P. VERNIN

*Station de Recherches sur la Viande, I.N.R.A.-C.R.Z.V.*
*Centre de Recherches de Clermont-Ferrand*
*Theix, 63110 Beaumont*

## Résumé

Nous avons étudié chez des moutons de race *Limousine*, âgés de 6 à 10 mois, l'effet d'un transport précédant l'abattage sur le taux de glycogène musculaire et l'évolution *post mortem* du pH musculaire, ainsi que les relations entre ces deux caractéristiques.

Chez les animaux abattus à l'issue d'un transport d'une durée de 4 h, le pH diminue plus lentement *post mortem* et se stabilise à une valeur plus élevée que chez les animaux témoins dans la plupart des muscles. Dans quelques muscles toutefois la valeur du pH ultime n'est pas sensiblement modifiée par ce traitement.

Les relations entre le taux de glycogène présent à l'abattage et la valeur du pH ultime sont discutées. Un taux de glycogène de l'ordre de 50 à 60 µ-résidus glycosyl par gramme de tissu frais est nécessaire dans les 4 muscles étudiés pour que le pH puisse atteindre ses plus basses valeurs potentielles. Nous observons que dans certains muscles (particulièrement *Rectus Abdominis* et *Pectoralis profundus*) la chute du pH s'interrompt alors qu'il subsiste une quantité non négligeable de glycogène.

Mots clés : *mouton, glycogénolyse, stress, qualités de la viande.*

## Introduction

Il est bien établi que la valeur à laquelle se stabilise le pH de la viande, à l'issue de l'installation de la *rigor mortis*, conditionne la plupart des caractéristiques technologiques et organoleptiques : tendreté, couleur, pouvoir de rétention d'eau,

microbiologie... Les travaux les plus importants sur ce sujet ont été ceux de Callow (1938) chez le Porc, Lawrie (1958) et Hedrick *et al.* (1959) chez le Bœuf, Bouton *et al.* (1971) chez le Mouton. Des variations importantes dans le pH ultime de la viande constituent un obstacle majeur à la mise en place et au développement de certaines techniques modernes de distribution de ce produit telles que la vente à l'état préemballé.

La valeur du pH ultime de la viande dépend essentiellement du taux de glycogène présent dans les muscles à l'abattage (Bate Smith et Bendall, 1949) et l'on sait que ce composé glucidique est largement affecté par les traitements de toute nature subis par les animaux durant la période précédant l'abattage (Lawrie, 1958; Hedrick *et al.*, 1959; Shoumkov et Gorbataya, 1973). Toutes les espèces de boucherie sont susceptibles de fournir des viandes à pH élevé (défini comme > 6), cependant les études relatives aux causes de variation du pH ultime ont été conduites pour la plus grande part chez le Bœuf; c'est en effet dans cette espèce que le problème se pose avec le plus d'acuité sur le plan économique. Pourtant le Mouton présente l'intérêt — outre le fait que, sa viande étant généralement vendue en l'état, les variations du pH ultime ont des conséquences marquées sur les qualités du produit mis à la disposition du consommateur — de pouvoir constituer un modèle expérimental plus pratique et moins dispendieux que le Bœuf. Forrest *et al.* (1964) ont montré que l'excitation ou l'exercice précédant l'abattage sont susceptibles d'augmenter notablement le pH de la viande chez l'Agneau. Plus récemment Brazal Garcia et Boccard (1977) ont observé de nettes modifications de la cinétique d'évolution *post mortem* du pH musculaire lorsque les animaux étaient soumis avant l'abattage à une excitation (provoquée par l'isolement) ou un transport simulé. Toutefois les effets d'un transport de durée moyenne, en véhicule automobile, tels que les animaux en subissent généralement lors du transfert de la ferme à l'abattoir, n'ont pas à notre connaissance été étudiés.

Nous avons donc cherché à connaître les conséquences d'un tel transport sur le taux de glycogène musculaire et le pH ultime de la viande chez le Mouton. En outre nous avons étudié la relation entre taux de glycogène musculaire à l'abattage et valeur du pH ultime. La connaissance de cette relation peut être avantageuse pour la réalisation de travaux où l'abattage des animaux n'est pas souhaitable, l'analyse de biopsies permettant d'apprécier l'impact éventuel sur le pH de la viande de traitements infligés aux animaux sans qu'il soit nécessaire d'abattre ces derniers.

## Matériel et méthodes

### I. — *Matériel animal*

Tous les animaux utilisés étaient des agneaux de race *Limousine*, mâles entiers, âgés de 6 à 10 mois. Ils étaient achetés dans des élevages privés au moins deux semaines avant les expériences. En principe, chaque essai utilisait des animaux du même élevage et une grande attention était portée à répartir les animaux de même père entre les groupes expérimentaux.

Tous les animaux recevaient chaque matin environ 0,5 kg d'un aliment concentré à base de céréales tant au pâturage qu'en bergerie où ils avaient du foin à volonté à leur disposition.

## II. — *Conduite des expériences et techniques expérimentales*

### 1. — *Conditions précédant l'abattage*

Chaque essai (sauf pour l'étude de la cinétique de chute du pH musculaire) utilisait 10 animaux répartis en 2 groupes de 5. Les agneaux étaient transférés la veille de l'abattage dans un local contigu à l'abattoir, où ils avaient à leur disposition du foin et de l'eau à volonté. Dans certains essais, les animaux étaient soumis à un prélèvement de sang (à la veine jugulaire) le matin de l'abattage. Cinq animaux (groupe témoin) étaient alors abattus dans un intervalle de temps d'environ une heure. Les 5 animaux restants étaient soumis à un transport réalisé dans un camion-bétaillère. L'intervalle de temps entre le chargement et le déchargement des animaux avant abattage était dans tous les cas de 4 heures. Dans certains cas les animaux étaient soumis à une prise de sang 2 heures après le départ, ce qui nécessitait un arrêt d'environ 30 min, puis de nouveau au moment du déchargement. Nous avons pu vérifier que ces prélèvements de sang n'affectaient pas significativement le taux de glycogène musculaire et le pH de la viande.

### 2. — *Abattage et prélèvement des muscles*

L'abattage était réalisé par égorgement. Pour les animaux transportés, il commençait dès après le dernier prélèvement de sang; compte tenu de leur nombre, les animaux étaient abattus entre 15 et 90 min environ après leur descente du camion.

Dès que l'éviscération était achevée (environ 20 min) des prélèvements étaient effectués sur les muscles RA, SSP, ST, PP*. Ces échantillons étaient aussitôt plongés dans l'azote liquide et conservés à — 20 °C pour extraction ultérieure.

La carcasse était ensuite placée dans une chambre froide réglée à + 10 °C pendant les 24 h suivantes.

### 3. — *Techniques analytiques*

On mesurait le pH :

— Sur les échantillons prélevés juste après l'abattage, dans un broyat du muscle dans 9 volumes d'iodoacétate 0,005 M glacé.

— 24 h après l'abattage, par application d'une électrode de verre combinée sur une coupe fraîche du muscle.

Après extraction dans 5 volumes de $HClO_4$ 0,6M glacé et neutralisation par $K_2CO_3$ 3M, l'acide lactique, l'ATP et le glucose étaient déterminés dans les échantillons musculaires par les méthodes respectivement de Gutman et Wahlefeld (1974), Jaworek *et al.* (1974) et Trinder (1969) adaptées à l'autoanalyseur. Le glycogène était dosé selon Dalrymple et Hamm (1973), le glucose résultant de l'hydrolyse enzymatique étant toutefois mesuré par la méthode de Trinder (1969) plutôt que par la méthode à la glucose-6-phosphate déshydrogénase et à l'hexokinase employée par ces auteurs.

Les taux de glycogène musculaire *in vivo* étaient estimés en appliquant la formule :

$$[\text{glycogène}]_0 = [\text{glycogène}]_{20} + \frac{[\text{acide lactique}]_{20}}{2}$$ où $[\text{glycogène}]_0$ est le taux de

glycogène musculaire à l'abattage, $[\text{glycogène}]_{20}$ la concentration en glycogène dans l'échantillon de muscle et $[\text{acide lactique}]_{20}$ la concentration en acide lactique dans le même échantillon. Cette formule néglige les intermédiaires de la voie EMBDEN-MEYERHOF, mais nous avons vérifié que, chez le Mouton, la concentration en glucose - 6 - phosphate, l'un des plus importants quantitativement dans la plupart des espèces, est très faible (généralement inférieur à 0,5 mM). Le taux de glycogène est exprimé en µ-résidus glycosyl (ou µmoles de glucose) par gramme de tissu frais.

4. — *Abréviations utilisées*

| | | |
|---|---|---|
| RA : *Rectus abdominis* | SSp : *Supraspinatus* | LD : *Longissimus dorsi* |
| PP : *Pectoralis profundus* | ISp : *Infraspinatus* | PS : *Psoas major* |
| ST : *Semi tendinosus* | TB : *Triceps brachii* | BF : *Biceps femoris* |

## Résultats

### I. — *Influence du stress de transport sur le taux de glycogène musculaire et sur l'évolution du pH musculaire « post mortem »*

1. — *Cinétique d'évolution du pH*

L'influence du transport avant abattage sur la cinétique de chute du pH dans 4 muscles est rapportée dans la figure 1. On observe chez les animaux transportés un pH initial légèrement supérieur et une évolution du pH plus lente.

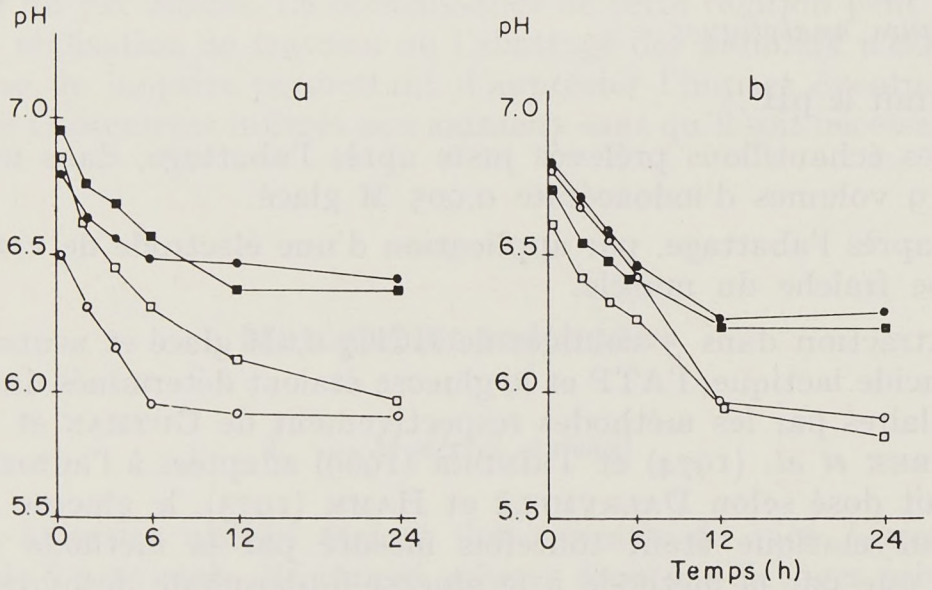



FIG. 1. — *Influence du transport des animaux avant l'abattage sur la cinétique de chute du pH musculaire dans 4 muscles*

$n = 3$ animaux dans chaque groupe expérimental.

| | | |
|---|---|---|
| —○— repos | a. *Rectus Abdominis* | b. *Pectoralis profundus* |
| —●— transport | a. *Rectus Abdominis* | b. *Pectoralis profundus* |
| —□— repos | a. *Semi tendinosus* | b. *Infraspinatus* |
| —■— transport | a. *Semi tendinosus* | b. *Infraspinatus* |

Nous avons comparé les pH, les taux d'ATP et d'acide lactique mesurés 20 min *post mortem* dans les muscles d'agneaux abattus au repos ou après transport. Nous avons pour cela analysé les résultats de 10 expérimentations comprenant chacune 5 animaux reposés et 5 transportés. Les résultats du tableau 1 montrent que les animaux transportés présentent une légère supériorité pour le pH ($P < 0,01$) et le taux d'ATP (différence non significative). Les taux d'acide lactique ne sont significativement différents que dans le *Supraspinatus* où l'on note une concentration légèrement supérieure chez les animaux transportés.

TABLEAU 1

*Valeurs du pH, de l'acide lactique et de l'ATP mesurés 20 minutes post mortem dans des muscles d'agneaux abattus au repos ou après transport (50 agneaux dans chaque groupe)*

| Caractéristiques | pH | | ATP µM/g | | Acide lactique µM/g | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Traitement / Muscle | R | T | R | T | R | T |
| *Rectus abdominis* | 6,54 ** | 6,64 | 1.9 | 2,3 | 25,1 | 23,2 |
| *Pectoralis profundus* | 6,83 ** | 6,90 | 3,4 | 3,6 | 14,0 | 14,4 |
| *Semitendinosus* | 6,59 ** | 6,68 | 3,2 | 3,4 | 22,9 | 21,5 |
| *Supraspinatus* | 6,93 ** | 7,02 | 3,3 | 3,3 | 9,0 ** | 10,4 |

(*) $P < 0.05$ R : repos
(**) $P < 0.01$ T : transport

## 2. — *Glycogène musculaire et pH ultime*

Nous rapportons ici les résultats obtenus au cours de 9 essais successifs (soit 45 animaux témoins et 45 traités) pour les taux de glycogène et de 10 essais (soit 50 témoins et 50 traités) pour les pH ultimes.

TABLEAU 2

*Influence du stress de transport sur le taux de glycogène musculaire à l'abattage dans 4 muscles du Mouton*

| Muscle | Glycogène µ-glycosyl/g | | P |
|---|---|---|---|
| | Repos ($n = 45$) | Transport ($n = 45$) | |
| *Semitendinosus* | 53,3 | 42,4 | * |
| *Supraspinatus* | 57,5 | 40,6 | ** |
| *Pectoralis profundus* | 54,7 | 44,7 | ** |
| *Rectus abdominis* | 36,9 | 33,3 | NS |

Le stress de transport provoque une diminution significative du taux de glycogène musculaire dans 3 des 4 muscles étudiés (tabl. 2). Il modifie également le pH ultime de la plupart des muscles (fig. 2).

Notons que chez les animaux reposés le pH ultime varie assez largement d'un muscle à l'autre, le *Rectus Abdominis* présentant le pH le plus élevé et le *Longissimus dorsi* le pH le plus bas. L'amplitude de la variation atteint 0,65 unité pH.

Il apparaît que le pH de certains muscles (*Infraspinatus, Supraspinatus Biceps femoris, Semi tendinosus,*) est très affecté par le stress de transport ($P < 0,01$). A l'inverse, celui des muscles *Longissimus dorsi, Psoas major, Semi membranosus* et *Adductor* ne subit que de faibles modifications.

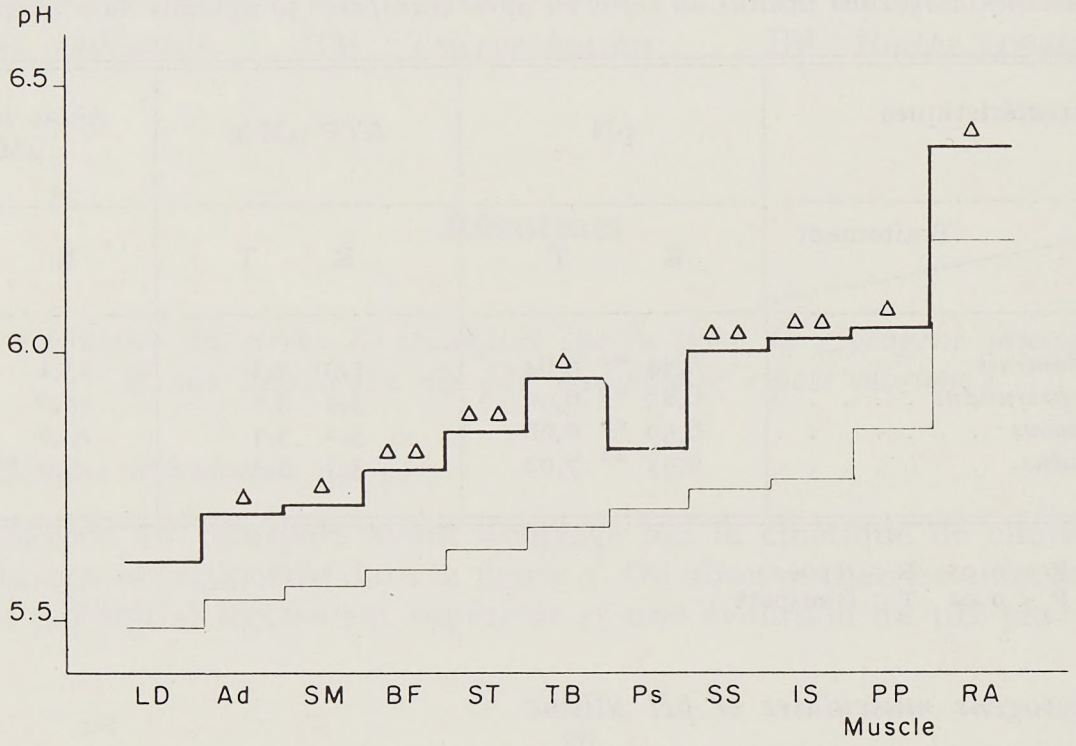



FIG. 2. — *Influence du stress de transport sur le pH ultime de 11 muscles du Mouton.*
- - - - animaux abattus au repos $n = 50$
—— animaux abattus après transport $n = 50$
$\Delta$ $P < 0,05$ $\Delta\Delta$ $P < 0,01$

## II. — *Relations entre le taux de glycogène à l'abattage et le pH de la viande*

La figure 3 montre la relation entre le taux de glycogène à l'abattage et le pH ultime de la viande dans les muscles *Pectoralis profundus* et *Supraspinatus*. Les équations de régression liant la valeur du pH ultime à celle du taux de glycogène dans 4 muscles sont données dans le tableau 3. Ces équations ne sont valables que pour des taux de glycogène inférieurs ou égaux à une valeur limite, variable avec le muscle et correspondant au pH ultime minimal qui peut être atteint dans le muscle. En effet quel que soit le taux de glycogène au-dessus de cette valeur limite, le pH de la viande reste constant. Ceci est particulièrement net pour le muscle *Supraspinatus* où le pH ultime reste aux environs de 5,70 lorsque le taux de glycogène s'élève de 50 à 80 µ-glycosyl/g (fig. 3). Les équations de régression ont donc été calculées en éliminant les valeurs des taux de glycogène supérieures à la valeur limite appréciée graphiquement.

TABLEAU 3

*Relation entre le taux de glycogène musculaire à l'abattage (glycogène)$_0$ et le pH ultime de 4 muscles*

Le glycogène est exprimé en µ-glycosyl/g

| Muscle | Équation de régression | Coefficient corrélation | P |
|---|---|---|---|
| *Rectus Abdominis* . . . . . | pH : 6,81-0,016 (glycogène)$_0$ | — 0,65 | ** |
| *Pectoralis profundus* . . . . . | pH : 6,89-0,020 (glycogène)$_0$ | — 0,92 | ** |
| *Semitendinosus*. . . . . | pH : 6,37-0,014 (glycogène)$_0$ | — 0,87 | ** |
| *Supraspinatus*. . . . . | pH : 6,57-0,016 (glycogène)$_0$ | — 0,91 | ** |

La relation entre le taux de glycogène à l'abattage et le pH est assez étroite dans trois des muscles étudiés ($r$ = 0,87 à 0,92), elle est nettement plus lâche dans le *Rectus abdominis*. Des différences notables sont observées entre les coefficients de régression de 0,014 dans le *Semitendinosus* à 0,020 dans le *Pectoralis profundus* ; cependant dans les 4 muscles la présence de 50 à 60 µ glycosyl de glycogène par gramme de tissu frais est nécessaire pour permettre au pH ultime d'atteindre ses plus basses valeurs potentielles.

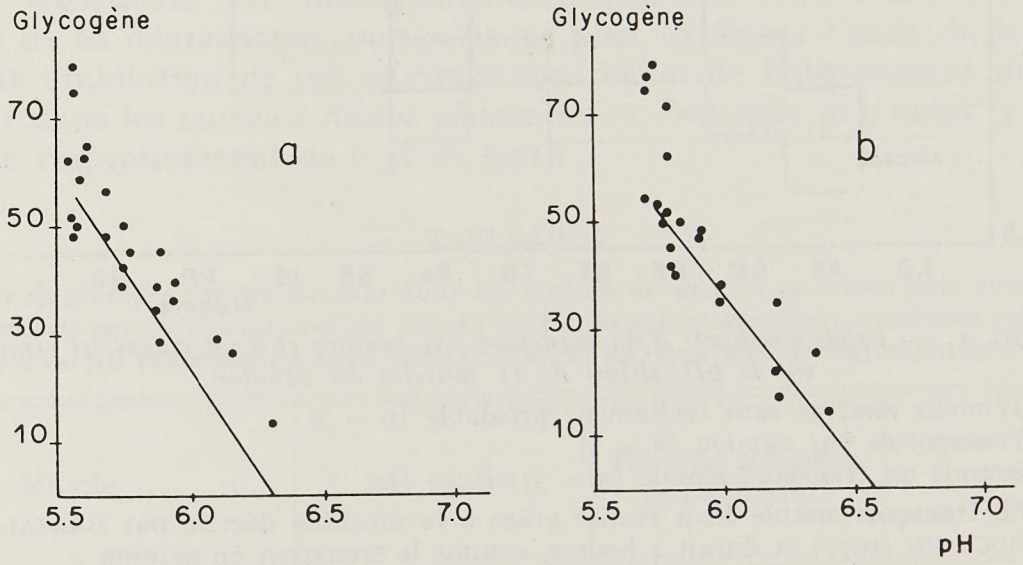



FIG. 3. — *Relations entre le taux de glycogène estimé à l'abattage et le pH ultime dans les muscles* Semitendinosus (*a*) *et* Supraspinatus (*b*) *du Mouton.*

Chaque point représente la moyenne des résultats obtenus sur un groupe expérimental de 5 animaux. Le taux de glycogène est exprimé en µ-résidus glycosyl par gramme de tissu frais.

## Discussion

### 1. — *Effets du transport sur l'évolution « post mortem » du pH musculaire*

Les résultats relatifs à l'influence du stress précédant l'abattage sur le pH initial et sa vitesse de chute ultérieure dans les muscles d'agneaux vont apparemment à l'encontre des observations de BRAZAL GARCIA et BOCCARD (1977); ces

auteurs rapportent dans la plupart des muscles une accélération de la chute du pH chez des animaux isolés la nuit précèdant l'abattage (l'isolement provoque chez le mouton frayeur et excitation) ou soumis à un transport simulé. SHORTHOSE (1978) décrit un effet similaire, quoique moins prononcé, de la frayeur provoquée chez les animaux par l'abattage de leurs congénères. Ces divergences peuvent être attribuées aux différences dans la nature des stress appliqués aux animaux et aux méthodes de mesure du pH (mesure directe sur une coupe de muscle par BRAZAL et BOCCARD, 1977). Le transport simulé n'a pas en effet les mêmes résultats que le transport en véhicule automobile, il affecte beaucoup moins le pH ultime de la viande, comme cela ressort des résultats de BRAZAL GARCIA et BOCCARD (1977) et comme nous avons pu le vérifier nous-mêmes (fig. 4).

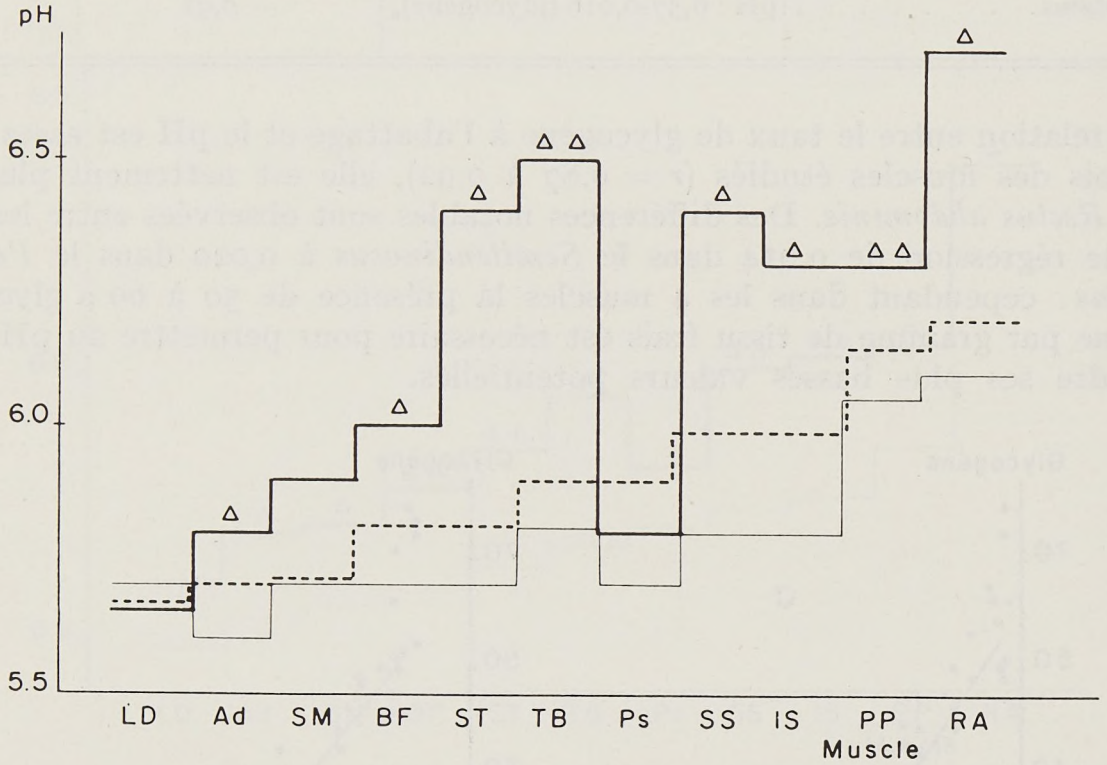



FIG. 4. — *Effets comparés d'un transport par camion et d'un transport simulé sur le pH ultime de 11 muscles du Mouton.*

——— Témoins abattus sans traitement préalable ($n = 3$)
——–—– Transportés par camion ($n = 3$)
- - - - - - Soumis au transport simulé ($n = 3$)

— Le transport simulé était réalisé grâce à la machine décrite par BRAZAL, GARCIA et BOCCARD (1977) et durait 4 heures, comme le transport en camion

— Différence entre les témoins et les animaux transportés : $\Delta$ $P < 0{,}05$ $\Delta\Delta$ $P < 0{,}01$ Aucune différence significative n'a été observée entre les animaux témoins et les animaux soumis à la simulation de transport.

Quoi qu'il en soit, il apparaît que la vitesse d'évolution *post mortem* du pH musculaire est plus facilement perturbée par les traitements accompagnant l'abattage chez l'ovin que chez le bovin, espèce chez laquelle le transport, par exemple, ne paraît pas affecter de façon notable la cinétique de chute du pH (MONIN, observations non publiées).

L'élévation du pH ultime engendrée par le stress de transport varie notablement d'un muscle à l'autre. Ici encore le comportement individuel des divers muscles diffère nettement de celui observé chez le Bœuf; ainsi par exemple le pH du muscle *Supraspinatus* est modifié de façon sensible chez les agneaux transportés,

alors que chez les bovins il s'agit d'un des muscles les moins affectés lorsque le pH ultime moyen de la carcasse s'élève (SORNAY et LEGRAS, 1978). La même observation est vraie pour d'autres muscles. Ceci pose donc le problème de la validité de l'emploi du Mouton comme modèle expérimental dans l'étude du déterminisme du pH ultime chez les Ruminants de boucherie. En fait, sous la réserve que les résultats ne sont pas transposables muscle à muscle d'une espèce à l'autre, il existe une grande similitude dans la réaction au stress de transport mesurée au niveau du muscle *post mortem*, les deux espèces réagissant surtout par une élévation du pH ultime, plus que par des modifications de la cinétique d'évolution du pH; même chez le Mouton, celle-ci n'est que peu perturbée. En outre dans les deux espèces les variations individuelles dans la vitesse de chute du pH sont faibles, comparativement à ce que l'on observe chez le Porc par exemple.

Les valeurs du pH ultime que nous avons observées chez les animaux au repos sont très proches de celles que rapportent BRAZAL GARCIA et BOCCARD (1977) pour 6 muscles communs aux deux études, à l'exception du *Pectoralis profundus* où la moyenne de nos observations s'établit à 5,84 contre 5,62 pour ces auteurs. Pour le muscle *Rectus Abdominis*, FORREST *et al.* (1964) indiquent un pH moyen de 6,06 pour des agneaux abattus au repos, comparable à notre valeur de 6,14. La stabilisation du pH à des valeurs relativement élevées dans un certain nombre de muscles ne peut être attribuée à l'épuisement total du glycogène musculaire; en effet nous avons observé des taux de glycogène résiduel non négligeables même dans des muscles présentant un pH relativement élevé, quelques exemples de ces observations sont rapportés dans le tableau 4. Il semblerait donc qu'une partie du glycogène musculaire soit difficilement accessible *post mortem* aux enzymes responsables de sa dégradation, puisqu'on ne peut expliquer l'arrêt de la glycogénolyse par l'inhibition de ces enzymes sous l'effet de l'abaissement du pH, en particulier dans les muscles *Rectus abdominis* et *Pectoralis profundus* (valeurs du pH ultime respectivement de 6,32 et 5,92).

TABLEAU 4

*Taux de glycogène et pH mesurés dans des muscles de mouton 24 heures* post mortem
*Les résultats ont été obtenus sur un groupe de 5 agneaux abattus sans traitement préalable*
La « chute de pH potentielle » a été calculée d'après les équations de régression du tableau 2

| Muscle | pH ultime | Taux de glycogène (-µglycosyl/g) | Chute de pH potentielle (unité pH) |
|---|---|---|---|
| *Rectus Abdominis* . . . . . | 6,32 | 11 | 0,18 |
| *Pectoralis profundus* . . . . . | 5,92 | 12 | 0,27 |
| *Supraspinatus*. . . . . | 5,70 | 17 | 0,25 |

Il semble qu'il y ait une relation entre le pH ultime et le type métabolique des muscles; des investigations en cours dans notre laboratoire révèlent en effet que les 4 muscles présentant les pH ultimes les plus bas peuvent être considérés comme « rouges-rapides » (à métabolisme aérobie prédominant et vitesse de contraction élevée), alors que l'*Infraspinatus* et le *Supraspinatus* seraient « rouges lents »; les « blancs rapides » *Psoas major* et *Semi tendinosus* présentent un pH ultime intermédiaire. Un pH ultime plus faible caractériserait donc les muscles à contraction rapide, indépendamment de leur capacité oxydative.

II. — *Relations entre le taux de glycogène musculaire et l'évolution du pH*

L'examen des courbes de régression du pH ultime en fonction du taux de glycogène musculaire *in vivo* semble *a priori* indiquer que dans deux au moins des muscles étudiés il y aurait abaissement du pH musculaire après la mort même avec un taux de glycogène initial nul, puisque le pH se stabiliserait aux environs de 6,50. Ceci est probablement lié au fait que nous apprécions le taux de glycogène *in vivo* en partie d'après le taux d'acide lactique mesuré *post mortem* et supposé représenter exactement le glycogène musculaire dégradé depuis l'abattage. Or la transformation du glycogène en acide lactique n'est pas absolument stœchiométrique chez le Mouton (Follett et Ratcliff, 1969) comme d'ailleurs dans d'autres espèces (Porc : Charpentier, 1968; Bœuf : Hamm *et al.*, 1973) : il disparaîtrait pendant la glycogénolyse *post mortem* plus de glycogène qu'il n'apparaît d'acide lactique. Si cela est vrai dès les premiers instants suivant la mort, le taux de glycogène présent dans le muscle à l'abattage est sous-estimé par notre méthode d'appréciation, la correction que nous appliquons au taux de glycogène réellement déterminé par l'addition de la moitié de la concentration en acide lactique étant insuffisante. De ce fait, pour le pH correspondant à l'intersection de la courbe de régression et de l'axe des abscisses, sur la figure 3, le taux de glycogène pourrait en réalité être non négligeable, en particulier dans le muscle *Semi tendinosus*.

Shorthose (1978) rapporte une relation négative entre le taux de glycogène à l'abattage et la vitesse de la chute ultérieure du pH. Or nous avons observé au contraire que le stress de transport diminue simultanément le taux de glycogène et la vitesse d'évolution du pH, la relation entre ces deux caractères ne semble donc pas simple. Il paraît logique que lors des travaux réalisés par Shorthose, le stress subi par les animaux accélérant la glycogénolyse *post mortem*, et l'échantillonnage des muscles étant réalisé 15 à 30 min *post mortem*, les muscles présentant la glycogénolyse la plus rapide aient dégradé à ce moment plus de glycogène se présentent ainsi à la fois le pH et le taux de glycogène les plus bas. Cette relation entre taux de glycogène au moment de la mort et cinétique d'évolution du pH mériterait une investigation supplémentaire en considérant les deux formes du polyoside dans le muscle, lyo- et desmoglycogène, dont Charpentier (1966) a montré que la proportion est liée, chez le Porc, au rythme de la glycogénolyse *post mortem*.

## Conclusion

L'influence des stress infligés avant l'abattage sur l'évolution du pH *post mortem* chez l'agneau dépend de la nature de ces stress; si, selon plusieurs auteurs, la frayeur ou l'excitation accélèrent la glycogénolyse sans augmenter beaucoup le pH ultime, le transport durant plusieurs heures immédiatement avant l'abattage augmente notablement la valeur du pH ultime en tendant à diminuer la vitesse de chute.

Un point intéressant à préciser lors d'investigations futures concerne la connaissance des mécanismes responsables de l'arrêt de la glycogénolyse *post mortem*. Dans certains muscles en effet le pH se stabilise à des valeurs peu favorables à la

conservation de la viande à l'état réfrigéré (pH > 5,9) alors qu'il subsiste dans le muscle une quantité de glycogène non négligeable. Une connaissance approfondie du déterminisme de la cessation de la glycogénolyse aiderait certainement à mieux maîtriser la valeur du pH ultime.

*Reçu pour publication en décembre 1979.*

## Summary

*Muscle glycogen level, transport stress and ultimate pH of mutton*

The effect of transport by truck before slaughter on muscle glycogen and muscular pH fall, was investigated in lambs of 6 to 10 months of age. The relationships between the glycogen level at slaughter and the pH fall were also studied.

It was found that in animals slaughtered after four hours transport, the pH fall was slower and stopped at a higher value than that of the control animals. In some muscles (*Longissimus dorsi*, *Psoas major*) however, the ultimate pH of the muscle was not affected by the treatment.

A glycogen level of about 50 to 60 μ-glycosyl units per gram of fresh tissue was found to be necessary to allow a maximal pH fall in the four muscles studied. The regression coefficients between glycogen level and ultimate pH vary from 0.014 (*Semitendinosus* muscle) to 0.020 (*Pectoralis profundus* muscle). In some muscles the pH fall stops at a rather high value although glycogen is not totally depleted.

## Références bibliographiques

Bate Smith E. C., Bendall J. R., 1949. Factors determining the time course of *rigor mortis*. *J. Physiol.*, **110**, 47-65.

Bouton P. E., Harris P. V., Shorthose W. R., 1971. Effect of ultimate pH upon the water holding capacity and the tenderness of mutton. *J. Food Sci.*, **36**, 435-439.

Brazal Garcia T., Boccard R., 1977. Efectos de dos tratamientos *ante mortem* sobre la calidad de la canal y la carne de cordero. *An. Inst. Nac. Invest. Agron.*, **8**, 97-120.

Callow E. H., 1938. Muscular fatigue and pH. *Ann. Rept. Food Invest. Board, Great Britain*, 53 p.

Charpentier J., 1966. Relations entre la teneur du muscle de Porc en desmo et lyoglycogène et l'intensité de la glycogénolyse *post mortem*. *Ann. Zootech.*, **15**, 367-371.

Charpentier J., 1968. Glycogénolyse *post mortem* du muscle *Longissimus dorsi* du Porc. *Ann. Zootech.*, **17**, 429-443.

Dalrymple R. H., Hamm R., 1973. A method for the extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. *J. Food Technol.*, **8**, 439-444.

Hamm R., Dalrymple R., Honikelk, 1973. On the *post mortem* breakdown of glycogen and ATP in skeletal muscle. 23e Réunion Européenne des Chercheurs en Viande, Paris 2-7 septembre 1973.

Hedrick M. B., Boillot J. R., Brady D. E., Naumann M. D., 1959. Etiology of dark cutting beef. *Res. Bull.*, 717, University of Missouri, Agricultural Experiment Station, 10-60.

Gutmann J., Wahlefeld W. A., 1974. Lactate determination with LDH and NAD. *in* " Methods of Enzymatic Analysis ". Bergmeyer H.U. editor, Academic Press Inc., New York and London.

Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H. U., 1974. Adenosine-5'-triphosphate, Determination with 3 phosphoglyceratekinase. *In* " Methods of enzymatic analysis ", Bergmeyer H. U. editor. Academic Press Inc., New York and London.

Follet M. J., Ratcliff P. W., 1969. Studies on the *post mortem* glycolytic changes in the *M. Semimembranosus* of lamb and beef. *15th European Meeting of Meat Research Workers*, Helsinki, Finland, August 17-24, 1969.

Forrest J. C., Merkel R. A., Mackintosh D. L., 1964. Influence of preslaughter treatment upon certain physical and chemical characteristics of ovine muscle. *J. Anim. Sci.*, **23**, 551-554.

LAWRIE R. A., 1958. Physiological stress in relation to dark cutting beef. *J. Sci. Food Agric.*, **9**, 721-727.

SHORTHOSE W. R., 1978. Effects of level of feeding, preslaughter stress and method of slaughter on *post mortem* glycolysis of sheep muscles. *Meat Science*, **2**, 189-198.

SHOUMKOV E. G., GORBATAYA N. P., 1973. The effect of cattle preslaughter maintenance on the biochemical indices of muscular tissue. 23e Réunion Européenne des Chercheurs en Viande. Paris, 2-7 sept. 1973.

SORNAY J., LEGRAS P., 1978. Cartographie du pH dans les carcasses de gros bovins. *Ind. Alim. Agric.*, **4** (avril 1978), 392-397.

TRINDER P., 1969. Determination of glucose in blood using an oxydase-peroxydase system with a non carcinogenic chromogen. *J. Clin. Pathol.*, **22**, 158-161.

*Ann. Technol. agric.*, 1979, **28** (4), 445-468.

# Mise au point sur l'action d'enzymes d'oxydoréduction en technologie boulangère. La maturation des farines de blé tendre et le pétrissage des pâtes

J. NICOLAS

*Laboratoire de Technologie Alimentaire, I.N.R.A. C.E.R.D.I.A., 91305 Massy*

## Résumé

Dans cette revue bibliographique, les phénomènes d'oxydation observés au cours de la maturation des farines et du pétrissage des pâtes sont rappelés. L'intervention de la lipoxygénase sur ces phénomènes est tout d'abord évoquée. Son effet sur la destruction des acides gras essentiels, la libération des lipides liés au cours du pétrissage, les propriétés rhéologiques et l'oxydation couplée des pigments caroténoïdes est présenté. Les produits non volatils et volatils dont elle induit la formation, et l'influence de ces derniers sur l'arôme de la mie du pain sont rappelés avec leur mécanisme de formation. L'hypothèse de l'oxydation couplée des groupements thiols des protéines du gluten est discutée.

Les actions spécifiques des peroxydase, catalase, polyphénoloxydase, acide ascorbique oxydase, acide déhydroascorbique réductase et protéine disulfure isomérase (réarrangease) sont présentées et leurs interactions avec la lipoxygénase sont envisagées.

Un schéma global situant la lipoxygénase à un véritable carrefour de réactions et permettant de regrouper l'ensemble de ses interrelations avec les différents systèmes enzymatiques envisagés est donné. Ainsi, les peroxydases et catalases catalysent l'oxydation des lipides insaturés par l'intermédiaire de leur groupement hématinique. Ces deux enzymes détruisent l'eau oxygénée fortement inhibitrice de la lipoxygénase. Les polyphénoloxydases provoquent l'oxydation des polyphénols qui, souvent, possèdent des propriétés antioxygènes donc inhibitrices de l'activité lipoxygénasique. Ces enzymes entrent en compétition avec la lipoxygénase pour l'utilisation de l'oxygène. C'est aussi le cas de la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique, lequel inhibe par ailleurs l'activité lipoxygénasique. Comme pour la lipoxygénase, on prête à l'acide déhydroascorbique formé, un pouvoir oxydant (catalysé par une déhydroascorbate réductase) vis-à-vis des groupements thiols conduisant à la formation de ponts disulfures. Enfin, la réarrangease possède un pouvoir catalytique sur les réactions d'échange entre les groupements thiols et les ponts disulfures, réactions dont l'importance est reconnue depuis longtemps pour leur influence sur les propriétés viscoélastiques des pâtes.

Mots clés : *panification, maturation, pétrissage, enzymes, lipoxygénase, peroxydase, catalase, polyphénoloxydase, acide ascorbique oxydase, acide déhydroascorbique réductase, réarrangease*

## Introduction

Bien que de nombreux travaux aient été publiés sur l'action des enzymes en technologie alimentaire, on ne trouve dans les ouvrages consacrés à ce domaine que de brefs paragraphes concernant l'effet des enzymes d'oxydoréduction en technologie boulangère (Reed, 1966; Axelrod, 1974). A notre connaissance, aucune synthèse récente n'a été faite sur ce sujet, notamment sur les interrelations pouvant exister entre les différents systèmes enzymatiques envisagés.

Dans cette mise au point, nous nous proposons de passer en revue la littérature concernant l'action d'enzymes d'oxydoréduction en panification et plus particulièrement pendant la maturation des farines et le pétrissage des pâtes de farine de blé tendre à l'exclusion des autres étapes du processus. Le plan adopté sera le suivant : après un bref rappel des phénomènes observés au cours de la maturation et du pétrissage, nous étudierons les interventions réelles ou hypothétiques de la lipoxygénase (E.C.1.13.11.12), de la peroxydase (E.C.1.11.1.7), de la catalase (E.C.1.11.1.6), de la polyphénoloxydase (E.C.1.14.18.1), de l'acide ascorbique oxydase (E.C.1.10.3.3), de la déhydroascorbique acide (DHA) réductase (E.C.1.8.5.1) et de la protéine disulfure isomérase ou réarrangease (E.C.5.3.4.1).

La plupart de ces enzymes ont été caractérisées dans le blé. La répartition des activités dans les diverses portions du grain ainsi que dans les différentes fractions de mouture du blé a été étudiée par quelques auteurs. L'ensemble des résultats est rassemblé dans le tableau 1. Du fait de la diversité des techniques de dosage utilisées et des substrats employés, la comparaison dans l'absolu des résultats publiés par les différents auteurs est illusoire. Cependant, il existe une certaine concordance permettant d'observer que le germe est riche en lipoxygénase, catalase peroxydase, DHA réductase et réarrangease alors que le son contient surtout de la polyphénoloxydase.

### *Maturation des farines*

Après la mouture des blés, les farines étaient autrefois volontairement stockées au moulin durant quelques semaines avant d'être utilisées. Pendant cette période, elles subissent diverses modifications d'ordre biochimique souvent favorables à leurs qualités boulangères. Le terme de « maturation » recouvre l'ensemble de ces phénomènes.

Les différents travaux sur la maturation ont été menés suivant trois directions comportant en particulier l'étude de l'évolution de la teneur en différents composants, des propriétés rhéologiques des pâtes et des qualités boulangères.

L'augmentation de « l'acidité grasse » au cours du stockage des farines est un fait acquis depuis de nombreuses années (Balland, 1904; Sharp, 1924; Bailey et Johnson, 1924; Fifield et Bailey, 1929; Cuendet *et al.*, 1954; Greer *et al.*, 1954; Gracza, 1965). Cette augmentation a été attribuée à l'apparition d'acides gras libérés à partir de triglycérides hydrolysés sous l'action de lipases (Sullivan et Howe, 1936; Miller et Kummerow, 1948; Gracza, 1965), lesquelles sont capables d'agir dans le milieu peu hydraté que constitue la farine (Drapron et Uzzan, 1968). Bellenger et Godon (1972) ont mis en évidence une augmentation

TABLEAU I

*Répartition des activités enzymatiques dans les différentes fractions du grain de blé obtenues après dissection ou mouture*

| Partie du blé ou fraction meunière | Lipoxygénase | | | Catalase | | Per-oxydase | Polyphénoloxydase | | D.H.A. réductase | Réarran-gease |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Blé entier | | | 7-11 | 29-109 | | 5,6-10,3 | 0-0,69 | 6-31 | | 0-0,45 |
| Farine | 2-22 ** | 2 | | 7-67 | 2,3 | 0,7-21 | 0-0,3 | | | |
| Son | 21-43 | 4,5 | | 134-573 | 4,5 | 8,1- 9,8 | 0,59-1,93 | 27-116 | | |
| Germe | | 32 | 62-84 | | 83-103 | | | | 70,7 | 0,8 |
| Break shorts (*) | 59-110 | 9,5 | | 137-879 | | 6,2-24,7 | 0,38-1,7 | | | |
| Reduction shorts (*) | 36,5-61 | | | 123-950 | | 5,4-15,4 | 0,8-2,2 | | | |
| Red dog (*) | 30-60 | | | 76-912 | | 3,5-17,3 | 0,39-2.1 | | | |
| Péricarpe | | | | | | | | | 0,6-1 | |
| Aleurone | | | | | | | | | 9,4-11,2 | |
| Endosperme | | | 1-3 | | | | | | 14,3-15,1 | 0-0,27 |
| Scutellum | | | 57-87 | | | | | | 68,5-71 | |
| Références | Honold et Stahmann (1968) | Miller et Kummerow (1948) | Blain et Todd (1955) | Honold et Stahmann (1968) | Haw-thorn et Todd (1955) | Honold et Stahmann (1968) | Honold et Stahmann (1968) | Milner et Gould (1951) | Carter et Pace (1964) | Grynberg (1977) |

(*) Nous avons conservé les termes américains sans les traduire. Ces fractions meunières contenant des proportions variables d'issues correspondent à des diagrammes de mouture qui sont différents de ceux utilisés en Europe.

(**) Du fait de la diversité des techniques employées, il nous paraît inutile de donner les définitions des unités employées. Le lecteur intéressé peut se rapporter aux articles originaux.

globale des acides gras libres dosés spécifiquement au cours du stockage, aussi bien en milieu aéré qu'en atmosphère confinée. Cependant les pourcentages relatifs d'acides linoléique et linolénique diminuent lorsque le stockage a lieu en milieu aéré. Ils observent également une décoloration plus importante des pigments caroténoïdes lors du stockage en présence d'air.

Outre la modification de la fraction lipidique, le stockage en milieu aéré provoque une diminution de la teneur en groupements thiols de la farine (Cuendet *et al.*, 1954; Tsen et Dempster, 1963; Pomeranz, 1971; Yoneyama *et al.*, 1970*a*). Lorsque le blé est stocké sous forme de grains, Rao *et al.* (1978) observent le même effet avec une augmentation concomitante des liaisons disulfures. Ces auteurs ont également observé que ces oxydations de groupements thiols en ponts disulfures conduisaient à une diminution de la teneur en gliadines de faibles poids moléculaires et une augmentation des gluténines pendant le stockage en milieu aéré. En travaillant sur la farine, Bellenger et Godon (1972) ont également obtenu une augmentation du rapport gluténine/gliadine, mais en observant une diminution du nombre de liaisons disulfures.

Parallèlement aux variations d'ordre biochimique, les propriétés rhéologiques des pâtes et par conséquent les qualités boulangères des farines, évoluent au cours de leur stockage. Ainsi dès 1930, Loeb met en évidence une augmentation de la pression et une diminution du gonflement de l'alvéogramme Chopin. En outre, Poisson *et al.* (1957), étudiant la conservation des farines entre 12,4 et 15,4 p. 100 d'humidité à différentes températures, ont observé, malgré l'absence de tout développement microbien, une évolution des caractéristiques de l'alvéogramme Chopin d'autant plus rapide que la température et la teneur en eau étaient plus élevées. Ils ont noté une augmentation du W, résultat confirmé par Bellenger et Godon (1972) lesquels précisent que ces effets ne se produisent pas ou peu lorsque le stockage est conduit en atmosphère confinée. A l'aide du farinographe Brabender, Yoneyama *et al.* (1970*a*) ont également montré une augmentation de consistance de la pâte lorsque la farine est stockée en présence d'air, là encore le stockage sous azote conserve à la farine ses qualités initiales. Ces mêmes auteurs (1970*b*) ont aussi étudié l'influence de la température du stockage et ont observé qu'en dessous de 0 °C la teneur en groupements SH et les propriétés rhéologiques des farines variaient très peu alors qu'à 30 °C les variations étaient importantes. Enfin, au cours du stockage de blés indiens sous forme de grains, Rao *et al.* (1978) ont observé jusqu'à quatre mois de stockage une augmentation du volume des pains obtenus à partir de la farine issue de ces grains. Par ailleurs, ils ont montré que cette augmentation était significativement corrélée au rapport SS/SH des teneurs en groupements disulfures et thiols de cette farine.

L'ensemble de ces constatations montre à l'évidence le rôle prépondérant joué par l'oxygène dans ces phénomènes. En dehors de la phase de lipolyse conduisant à la libération d'acides gras, la maturation des farines est gouvernée essentiellement par des réactions d'oxydoréduction. C'est ainsi que la maturation étant un phénomène relativement lent et difficile à maîtriser, les meuniers américains, en particulier, incorporent à leur farine des agents chimiques de maturation. Ceux-ci sont des oxydants tels que l'azodicarbonamide, les peroxydes d'acétone ou de benzoyle et le dioxyde de chlore, quelques-uns d'entre eux permettant aussi de détruire les pigments caroténoïdes afin d'obtenir une farine plus blanche (Pratt, 1971). Signalons que tous ces additifs sont interdits en France. En conclusion, les phénomènes observés sont parfois apparemment contradictoires rendant leur interprétation difficile.

### *Le pétrissage des pâtes*

Il n'est pas question de faire ici un état exhaustif de toutes les recherches effectuées sur le pétrissage mais d'indiquer seulement les travaux mettant en lumière les phénomènes dans lesquels les enzymes d'oxydoréduction sont susceptibles d'intervenir.

La pâte est obtenue par le mélange de farine, d'eau, de levure, de sel et d'un certain nombre d'autres additifs avec un apport variable d'énergie. Durant le pétrissage, on incorpore à la pâte de l'air donc de l'oxygène dont l'effet améliorant a été signalé par DEMPSTER *et al.* (1954).

La plus grande partie de l'oxygène absorbé par la pâte au cours du pétrissage est utilisé pour l'oxydation des acides linoléique et linolénique sous forme libre ou de monoglycérides (COSGROVE, 1956; SMITH et ANDREWS, 1957; HAWTHORN, 1961; GRAVELAND, 1970*a*, 1973*a* et *b*). Les autres acides gras ne sont pas affectés (DRAPRON et BEAUX, 1969; GRAVELAND, 1973*a* et *b*; MANN et MORRISON, 1974) bien que MORRISON (1963) puis MORRISON et MANEELY (1969) aient indiqué parfois le contraire.

Dans les pâtes, la proportion de lipides « libres », obtenus après extraction à l'aide d'un solvant apolaire, par rapport aux lipides « liés » extraits avec un mélange de solvants polaires-apolaires varie avec les modes de pétrissage. Ainsi, sans apport d'énergie le degré de liaison des lipides augmente faiblement avec la teneur en eau de la farine. Puis, dès le début du pétrissage et au-delà de 30 p. 100 d'humidité, la teneur en lipides libres diminue encore dans la pâte de 15 p. 100 (DANIELS, 1975). Les conditions de pétrissage influencent les proportions de lipides libres et liés, notamment des triglycérides (POMERANZ *et al.*, 1968; DANIELS *et al.*, 1966; CHUNG et TSEN, 1975). Lorsque l'on augmente la teneur en oxygène de l'atmosphère du pétrin, le taux de lipides libres augmente peu pour de faibles apports d'énergie et il devient plus important lorsque l'énergie fournie est plus grande (DANIELS *et al.*, 1970). Ces mêmes auteurs observent une augmentation de la quantité de lipides liés lorsque le pétrissage est effectué en milieu anaérobie.

La destruction des pigments caroténoïdes des farines et semoules de blé est un phénomène d'oxydation enzymatique depuis longtemps associé au pétrissage (IRVINE et WINKLER, 1950; HAWTHORN et TODD, 1955*b*; TSEN et HLYNKA, 1962; MATSUO *et al.*, 1970; DANIELS *et al.*, 1970; DRAPRON *et al.*, 1971; LAIGNELET *et al.*, 1972; NICOLAS, 1978; LAIGNELET, 1979).

En dehors de cet effet sur les pigments, le pétrissage affecte les groupements thiols et les ponts disulfures des protéines du gluten. Ainsi, SMITH *et al.* (1957), MATSUMOTO et HLYNKA (1959) puis SOKOL *et al.* (1960) ont démontré sans ambiguïté que lors d'un pétrissage en présence d'air, il se produit une oxydation des thiols. TSEN et BUSHUK (1963), BLOKSMA (1963) ont observé que la teneur en groupements thiols des pâtes est constante ou bien augmente légèrement pendant un pétrissage en absence d'oxygène. Selon MECHAM et KNAPP (1966), cette augmentation peut être importante surtout pour de longues durées de pétrissage sous azote.

Enfin, parmi les additifs incorporés à la farine en vue d'améliorer ses qualités boulangères, nombreux sont ceux qui possèdent une activité oxydante ou réductrice. En France, l'utilisation des oxydants signalés par BLOKSMA (1971) n'est pas permise. Le seul autorisé en panification française et couramment incorporé à la farine est l'acide ascorbique. Ce dernier est un réducteur mais il agit comme oxydant. Il est en effet reconnu depuis longtemps que l'effet améliorant de l'acide

ascorbique est dû à son produit d'oxydation par l'oxygène de l'air incorporé, l'acide déhydroascorbique (Melville et Shattock, 1938). Tsen (1965), en particulier, a démontré que l'acide ascorbique n'exerce aucun effet améliorant lors d'un pétrissage sous azote, contrairement à l'acide déhydroascorbique.

Nous allons examiner en détail l'intervention des différents systèmes enzymatiques sur les phénomènes évoqués ci-dessus.

## *Le système lipoxygénasique* (*E.C.*1.13.11.12)

Les propriétés des systèmes lipoxygénasiques des végétaux ont fait l'objet de deux bibliographies récentes (Veldink *et al.*, 1977; Eskin *et al.*, 1977), dans lesquelles sont étudiées en détail les caractéristiques de l'enzyme.

### *Oxydation des acides gras polyinsaturés*

Étant donné sa grande spécificité vis-à-vis des acides gras polyinsaturés possédant le système de doubles liaisons non conjugués cis-cis 1,4 pentadiène, il est clair que la lipoxygénase intervient pour la plus large part dans la destruction des acides linoléique et linolénique des pâtes de farine au cours du pétrissage. En effet, la perte en acides gras polyinsaturés, nulle lorsque le pétrissage est effectué sous azote, augmente quand l'atmosphère du pétrin est constituée d'oxygène pur ou bien lorsqu'on ajoute de la lipoxygénase purifiée (Graveland, 1968). En milieu modèle le premier stade de l'oxydation de l'acide linoléique est la formation, par l'intermédiaire de radicaux libres, de 9 et/ou 13 hydroperoxydes en proportions variables suivant les origines de la lipoxygenase et le pH de la réaction (Hamberg, 1971; Christopher *et al.*, 1972; Veldink *et al.*, 1972). Selon Graveland (1970*b*), les radicaux hydroperoxy formés à partir d'acide linoléique dans un extrait aqueux de farine conduisent à un mélange de 9 et 13 hydroperoxydes (L1) dont une partie est réduite en monohydroxydes (L2) (fig. 1), dans une suspension aqueuse de farine, il observe en plus la formation de trihydroxydes (L4). Enfin, dans une pâte il se forme en outre des composés hydroxy-époxy (L3) alors que les hydroperoxydes (L1) ne sont plus décelables. Avec une farine préalablement délipidée par l'éther de pétrole, on retrouve des hydroperoxydes (L1) dans la pâte mais la quantité de composés L3 et L4 a diminué. L'étude des cinétiques de formation des composés L3 et L4 pendant le pétrissage indique que ces derniers proviennent de l'hydrolyse des composés L3. Dans une suspension de farine où la quantité d'eau n'est pas limitante, les composés L3 ne peuvent être détectés du fait d'une hydrolyse très rapide. L'ensemble de ces résultats a conduit Graveland (1971) à proposer le schéma reproduit sur la figure 1 pour expliquer la formation des différents composés d'oxydation de l'acide linoléique. Dans tous les cas, le radical peroxy constitue le précurseur de ces composés. La formation de L3 et L4 n'est rendue possible que par la présence de la fraction de farine insoluble dans l'eau, laquelle dévie l'oxydation lipoxygénasique vers ces composés. Sur un milieu modèle constitué de gluténine et de lipoxygénase purifiée, Graveland (1970*b*) a d'ailleurs montré que cette dernière s'adsorbe sur la gluténine et que le rapport L4/(L1 + L2) est égal au rapport lipoxygénase adsorbée/lipoxygénase non adsorbée.

Par la suite, Mann et Morrison (1975) et Markwalder *et al.* (1975) ont confirmé certains des résultats de Graveland, notamment la formation de composés L4 dans les pâtes. Un peu plus tard, Graveland (1973*a*) a également observé, dans les suspensions de farine, la présence de faibles quantités de céto, cétohydroxy

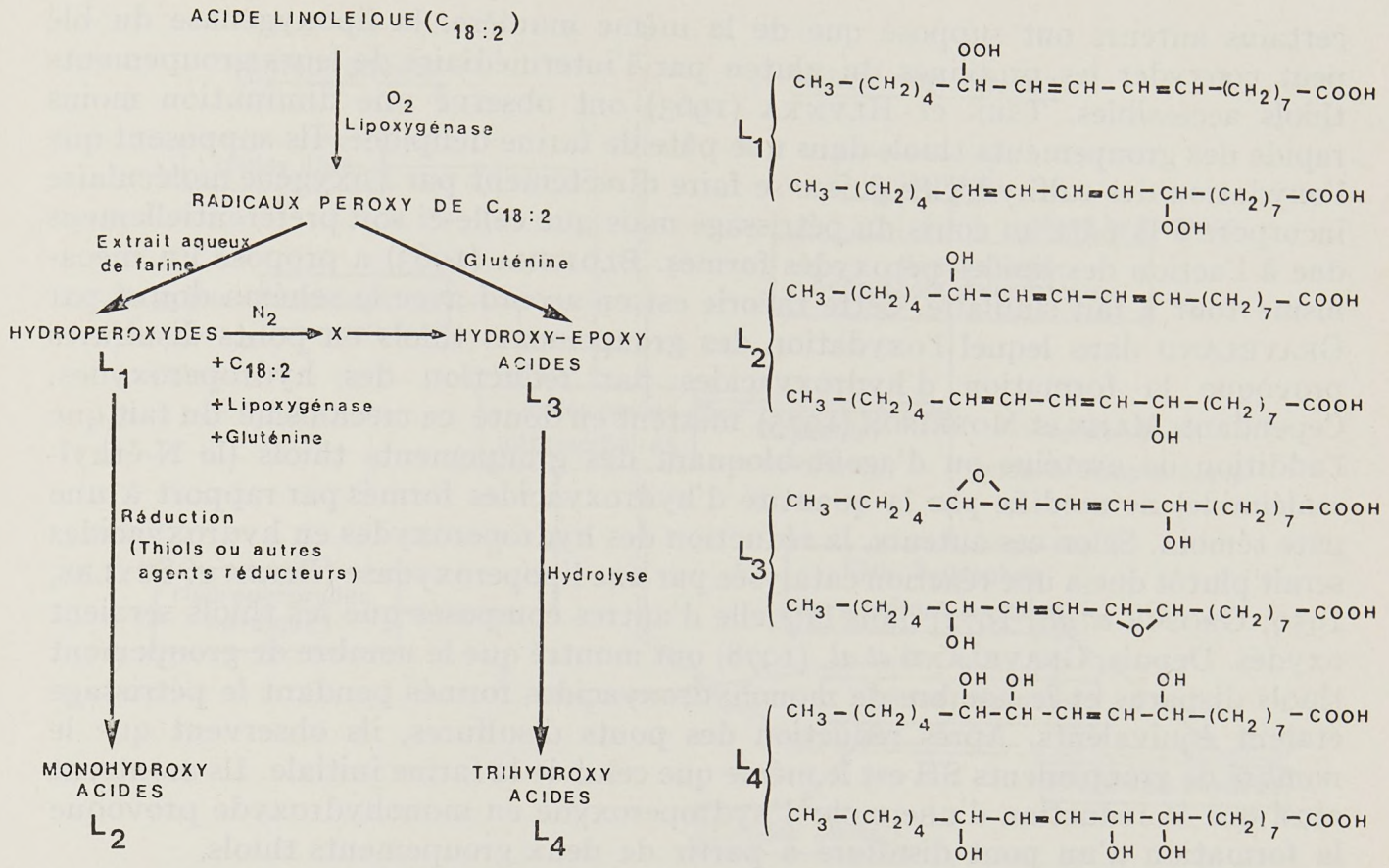



FIG. 1. — *Schéma réactionnel d'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase contenue dans un extrait aqueux, une suspension ou une pâte de farine proposé par* GRAVELAND (*1971*).

et de dihydroxy acides provenant de l'oxydation de l'acide linoléique. HEIMANN et DRESEN (1973) et HEIMANN *et al.* (1973) ont purifié à partir de l'avoine, des enzymes possédant une activité isomérasique vis-à-vis des hydroperoxydes L1 conduisant aux composés L3 puis L4 par hydrolyse et une activité lipoperoxydasique donnant des composés L2. La présence de telles enzymes dans le blé, quoique supposée, n'a jamais été à notre connaissance formellement démontrée. Par contre, ZIMMERMAN et VICK (1970) puis CHRISTIANSON et GARDNER (1975) ont mis en évidence dans le germe de blé des activités hydroperoxyde isomérasiques conduisant à des composés cétohydroxy acides. Enfin, GARDNER *et al.* (1974, 1977 et 1978) ont observé, à partir d'un mélange d'hydroperoxydes, de cystéine et de fer ferrique, la formation de nombreux composés parmi lesquels ceux cités plus haut ainsi que des composés d'addition avec la cystéine. En dehors des acides gras polyinsaturés libres, la lipoxygénase de blé oxyde également des monoglycérides. Lorsque de la farine de soja est incorporée à la farine de blé, l'oxydation des acides gras polyinsaturés estérifiés est plus importante (MORRISON et PANPAPRAI, 1975). De nombreux auteurs ont montré que le soja contient des isoenzymes capables d'agir sur l'acide linoléique estérifié (KOCH *et al.*, 1958; VIOQUE et CALDERON, 1967; GUSS *et al.*, 1968; CHRISTOPHER *et al.*, 1970; VERHUE et FRANCKE, 1972).

*Oxydation des groupements thiols*

Diverses hypothèses sont avancées pour expliquer la diminution de la teneur en groupements thiols au cours du pétrissage. S'appuyant sur l'observation de MAPSON et MOUSTAFA (1955) suivant laquelle la lipoxygénase de pois pouvait oxyder le glutathion réduit (2 GSH → GSSG) et former des ponts disulfures,

certains auteurs ont supposé que de la même manière, la lipoxygénase du blé peut cooxyder les protéines du gluten par l'intermédiaire de leurs groupements thiols accessibles. Tsen et Hlynka (1963) ont observé une diminution moins rapide des groupements thiols dans une pâte de farine délipidée. Ils supposent que l'oxydation des sulfhydryles puisse se faire directement par l'oxygène moléculaire incorporé à la pâte au cours du pétrissage mais que celle-ci soit préférentiellement due à l'action des lipides peroxydés formés. Bloksma (1963) a proposé un mécanisme tout à fait similaire. Cette théorie est en accord avec le schéma donné par Graveland dans lequel l'oxydation des groupements thiols en ponts disulfures provoque la formation d'hydroxyacides par réduction des hydroperoxydes. Cependant, Mann et Morrison (1975) mettent en doute ce mécanisme du fait que l'addition de cystéine ou d'agent bloquant des groupements thiols (le N-éthylmaléimide) ne modifie pas la quantité d'hydroxyacides formés par rapport à une pâte témoin. Selon ces auteurs, la réduction des hydroperoxydes en hydroxyacides serait plutôt due à une réaction catalysée par une lipoperoxydase (Blain et Styles, 1959; Grosch *et al.*, 1972) dans laquelle d'autres composés que les thiols seraient oxydés. Depuis, Graveland *et al.* (1978) ont montré que le nombre de groupement thiols disparus et le nombre de monohydroxyacides formés pendant le pétrissage étaient équivalents. Après réduction des ponts disulfures, ils observent que le nombre de groupements SH est le même que celui de la farine initiale. Ils montrent ainsi que la réduction d'une mole d'hydroperoxyde en monohydroxyde provoque la formation d'un pont disulfure à partir de deux groupements thiols.

*Libération des lipides liés. Effets rhéologiques*

Dès 1970, Daniels *et al.* ont observé une corrélation entre la libération des lipides et la destruction des pigments caroténoïdes, les conduisant à supposer une liaison entre les deux phénomènes. Ils ont proposé un mécanisme de libération des lipides liés aux protéines impliquant la lipoxygénase (fig. 2). Selon ces auteurs, les produits intermédiaires de l'oxydation résultant de l'action de la lipoxygénase sur les acides gras polyinsaturés sont capables d'accéder aux sites hydrophobes de fixation des lipides sur les protéines du gluten et oxydent les groupements thiols. Cette oxydation provoque une modification de la distribution des charges à la surface de la protéine conduisant à l'inversion de la micelle lipoprotéique et à l'apparition de sites hydrophiles. Dès lors, l'eau en entrant dans la structure protéique libère les lipides qui y sont fixés. Ces mêmes auteurs ont montré que la peroxydation des lipides se fait postérieurement à leur libération, celle-ci n'est donc pas une conséquence de la peroxydation. Frazier *et al.* (1973) observant que la libération des lipides n'est notable qu'en présence de farine de soja riche en lipoxygénase ou de lipoxygénase purifiée, un traitement thermique de la farine de soja supprimant cet effet, ont confirmé ce modèle. Ce dernier implique par ailleurs l'oxydation couplée des protéines du gluten suggérée antérieurement par Koch (1956) et Smith *et al.* (1957), conduisant donc à des modifications des propriétés rhéologiques des pâtes. Frazier *et al.* (1973) ont observé de telles modifications lors du développement mécanique des pâtes. Ils ont montré que la libération des lipides, en partie sous l'influence de la lipoxygénase, s'accompagne d'une augmentation du temps de relaxation des pâtes. L'importance de cet effet est d'autant plus nette que l'apport d'énergie à la pâte est grand, mais elle est en outre fonction de la vitesse d'apport de cette énergie. En effet, pour de faibles vitesses de pétrissage, cette amélioration des temps de relaxation des pâtes par la lipoxygénase est moins importante.

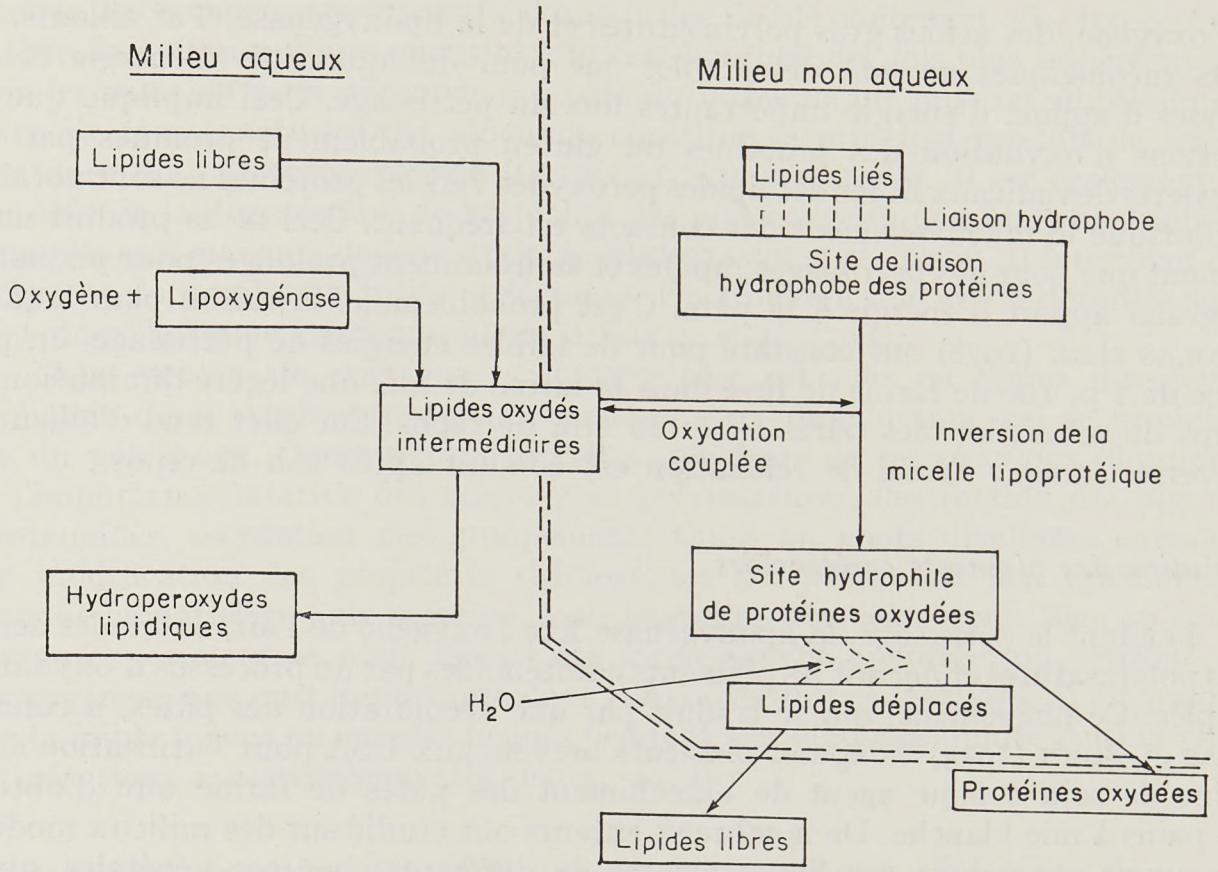



FIG. 2. — *Mécanisme de libération des lipides liés au cours du pétrissage en présence d'air proposé par* DANIELS *et al.* (1970).

Outre cet effet, la lipoxygénase augmente la tolérance des pâtes, c'est-à-dire qu'elle permet l'introduction d'une quantité d'énergie plus importante avant que la pâte ne « se relâche » (KOCH, 1956; FRAZIER *et al.*, 1973). Étant donné la fonction de la lipoxygénase, on peut penser que ces effets sont dus à des oxydations. D'une manière générale, les agents chimiques d'oxydation tels que l'iodate et le bromate de potassium et l'acide ascorbique augmentent la résistance des pâtes à l'extension. Ils améliorent leur machinabilité et permettent d'obtenir des pains plus développés. L'ensemble de ces effets est attribué à leurs actions d'oxydation vis-à-vis des thiols (HIRD et YATES, 1961; TSEN et BUSHUK, 1963; TSEN, 1965). Cependant certains oxydants rapides tels que l'iodate de potassium ou le bromate de potassium à pH 4,7 provoquent une diminution de la tolérance (SULLIVAN *et al.*, 1961; WEAK *et al.*, 1977), contrairement à l'effet de la lipoxygénase. Cette différence de comportement pourrait être le résultat d'une action spécifique de la lipoxygénase sur les zones hydrophobes du réseau glutineux (FRAZIER *et al.*, 1973). Par la suite FRAZIER *et al.* (1977), lors d'expériences de fractionnement et de reconstitution de la farine ont pu préciser que les phénomènes rhéologiques observés ne se produisent qu'en présence de lipides libres polyinsaturés. L'addition de lipides oxydés (par irradiation U.V. ou enzymatiquement) à une pâte pétrie sous azote ne conduit qu'à de très faibles améliorations des propriétés rhéologiques. D'autre part, l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA), inhibiteur de l'activité lipoxygénasique (YASUMOTO *et al.*, 1970; NICOLAS et DRAPRON, 1977) lorsqu'il est ajouté à la pâte, s'il réduit beaucoup la formation de peroxydes ne diminue que faiblement les effets rhéologiques dus à la lipoxygénase. Il semble donc que ces derniers ne se produisent que lorsque l'oxydation des lipides polyinsaturés s'effectue dans la pâte pendant le pétrissage. Ainsi, selon FRAZIER *et al.* (1977), l'effet de cooxydation du gluten ne se fait qu'en présence simultanée

de l'oxygène, des acides gras polyinsaturés et de la lipoxygénase. Par ailleurs, ces effets rhéologiques ne sont détectables que pour des quantités d'énergie et des vitesses d'apport d'énergie importantes lors du pétrissage. Ceci implique que les réactions d'oxydation des protéines du gluten probablement promues par des transferts de radicaux libres des lipides peroxydés vers les protéines ne sont notables que lorsque le renouvellement des contacts est fréquent. Ceci ne se produit notablement que pour des pétrissages rapides et suffisamment prolongés pour permettre un grand apport d'énergie à la pâte. C'est probablement la raison pour laquelle Nicolas *et al.* (1978) ont constaté pour de faibles énergies de pétrissage, en présence de 1 p. 100 de farine de fève dans la farine de blé, une légère diminution du temps de relaxation des pâtes après 20 min de repos. Cet effet tend d'ailleurs à s'inverser lorsque l'essai de relaxation est conduit après 2 h de repos.

*Évolution des pigments caroténoïdes*

Pendant le pétrissage, la lipoxygénase fixe l'oxygène de l'air, oxyde les acides gras polyinsaturés et détruit les pigments caroténoïdes par un processus d'oxydation couplée. Ce phénomène, qui se traduit par une décoloration des pâtes, a conduit Haas et Bohn (1934) à déposer plusieurs brevets aux USA pour l'utilisation de la farine de soja comme agent de blanchiment des pâtes de farine afin d'obtenir des pains à mie blanche. De nombreux auteurs ont étudié sur des milieux modèles le pouvoir cooxydant des lipoxygénases de différentes sources végétales sur le β-carotène (Arens *et al.*, 1973; Grosch *et al.*, 1977; Kies *et al.*, 1969; Weber *et al.*, 1973; Weber *et al.*, 1974; Zinsou, 1971). La première méthode proposée pour la mesure de l'activité lipoxygénasique est d'ailleurs basée sur ce pouvoir cooxydant (Sumner et Sumner, 1940). A l'exception de l'isoenzyme extraite du soja dont l'optimum d'activité se situe à pH 9, toutes les autres isoenzymes dont le pH optimum est voisin de la neutralité ont un pouvoir cooxydant élevé. Récemment, Ramadoss *et al.* (1978) ont montré que l'oxydation couplée du carotène par les lipoxygénases du soja nécessite la présence de deux isoenzymes.

Nicolas (1978) a étudié l'influence de différents paramètres du pétrissage sur la destruction des pigments caroténoïdes. La quantité de pigments oxydés augmente avec la durée et la vitesse du pétrissage ainsi qu'avec l'hydratation des pâtes. L'addition de farine de fève ou de lipoxygénases purifiées de fève ou de soja provoque une augmentation de la vitesse de destruction des pigments au cours du pétrissage. L'inverse est observé quand on ajoute à la pâte de l'acide ascorbique, de l'eau oxygénée ou un antioxygène tel que le 2,6 di-tert-butyl-p-crésol (BHT) qui sont tous des composés inhibiteurs du système lipoxygénase-acides gras polyinsaturés. Outre les caroténoïdes, les tocophérols sont en partie détruits lors du pétrissage par oxydation couplée sous l'action de la lipoxygénase (Drapron *et al.*, 1971). Les vitamines B1 et B6, hydrosolubles, pourtant sensibles à l'oxydation ne sont pas affectées (Drapron *et al.*, 1974). Ces différences de comportement sont dues selon les auteurs, aux caractères hydrophobes des caroténoïdes et des tocophérols à l'opposé des vitamines B1 et B6.

*Influence sur l'arôme du pain*

En panification française, l'utilisation de la technique dite de pétrissage intensifié et l'incorporation de farine de fève dans la farine de blé provoquent une modification de l'arôme du pain (Beaux, 1970; Étienne et Dubois, 1974; Chargelègue, 1974). Drapron *et al.* (1974) ont mis en évidence dans la mie de pain

obtenue après pétrissage intensifié d'une farine de blé contenant 2 p. 100 de farine de fève, la présence d'une quantité d'hexanal normal dix fois plus importante que dans les mies de pain obtenues à partir de farine de blé pure ou additionnée de farine de fève inactivée. Cet aldéhyde constitue le principal produit de scission spontanée du 13-hydroperoxyde (LOURY et FORNEY, 1968). Il est également responsable de la dégradation de la qualité des pois congelés non blanchis (riches en lipoxygénase) au cours de leur stockage (BENGTSSON *et al.*, 1967). Il intervient dans la flaveur de nombreux fruits et légumes. On trouvera une étude détaillée sur ce sujet dans la revue bibliographique d'ESKIN *et al.* (1977).

Nous venons de voir que la lipoxygénase est plus ou moins directement impliquée dans la plupart des phénomènes d'oxydoréduction qui se produisent lors du pétrissage. Quoique plus discrètes, plusieurs de ces réactions (diminution de l'importance relative des acides gras polyinsaturés, destruction des pigments caroténoïdes, oxydation des groupements thiols en ponts disulfures entraînant une modification des propriétés rhéologiques des pâtes) ont lieu également au cours de la maturation de la farine, mais beaucoup plus lentement. Bien qu'aucune preuve expérimentale n'ait jamais été formellement apportée, on attribue à la lipoxygénase une part importante dans la catalyse de ces réactions. Il est probable que la faible teneur en eau des farines pendant leur stockage, limite ainsi la vitesse des réactions enzymatiques (DRAPRON, 1972).

*Les systèmes peroxydasiques (E.C.1.11.1.7) et catalasiques (E.C.1.11.1.6)*

Très peu de travaux ont été publiés sur l'action de ces enzymes en panification. Cependant elles sont capables par l'intermédiaire de leur groupement hématinique d'oxyder les lipides insaturés avec apparition de radicaux libres intermédiaires, donc de provoquer des réactions similaires à celles catalysées par la lipoxygénase. En outre, par leur action catalytique elles favorisent l'activité lipoxygénasique, celle-ci étant fortement inhibée par l'eau oxygénée (MITSUDA *et al.*, 1967; EGMOND *et al.*, 1975).

Leurs présences dans le blé sont connues de longue date (BLISH et BODE, 1935; WALLERSTEIN *et al.*, 1948). Plusieurs isoenzymes peroxydasiques ont été isolées du blé dur (JEANJEAN *et al.*, 1975) et du germe de blé tendre (SHIN et NAKAMURA, 1961; SEQUI *et al.*, 1968; ZMRHAL et MACHACKOVA, 1978). La répartition des activités peroxydasiques et catalasiques a été étudiée dans les différentes fractions de mouture par HONOLD et STAHMANN (1968) et EVANS et MECHAM (1971). IRVINE *et al.* (1954*a* et *b*) ont étudié l'activité catalasique de différents blés américains. KRUGER et LABERGE (1974) puis KRUGER (1977) ont examiné l'évolution des activités peroxydasiques et catalasiques dans le grain de blé au cours de sa croissance et de sa maturation.

Du point de vue technologie boulangère, HAWTHORN et TODD (1955*a* et *b*) ont montré que la catalase ajoutée à la pâte provoque une accélération de la destruction des pigments caroténoïdes au cours du pétrissage. NICOLAS (1978) a observé le même phénomène avec la peroxydase. Quelques auteurs leur attribuent un rôle dans des réactions oxydatives, notamment vis-à-vis des protéines, pouvant modifier les propriétés des pâtes durant le pétrissage (IRVINE *et al.*, 1954*a*, HONOLD et STAHMANN, 1968). Sur des milieux modèles composés de protéines, d'eau oxygénée, d'un donneur d'hydrogène et de peroxydase, STAHMANN (1977) a montré l'existence de telles réactions. Par des techniques électrophorétiques et chromatographiques, il observe que la peroxydase catalyse la polymérisation des protéines ainsi que la désamination des groupements $\varepsilon$-$NH_2$ des

résidus lysyls. Il indique d'autre part que les polyphénoloxydases, en présence de leurs substrats, provoquent des effets similaires et suggère que les radicaux libres ou les quinones, formés par ces enzymes, en agissant sur les résidus cystéinyls, méthionyls et lysyls sont responsables des phénomènes observés.

### *Le système polyphénoloxydasique (E.C.1.14.18.1)*

Depuis longtemps l'activité polyphénoloxydasique a été décelée dans le blé (Bertrand et Muttermilch, 1907). Taneja *et al.* (1974) et Kruger (1976) indiquent que l'activité monophénolasique est très faible dans le blé immature. Elle passe par un maximum 6 semaines après l'anthèse (Taneja *et al.*, 1974). L'activité polyphénoloxydasique importante dans le blé immature décroît pendant la maturation du grain. Selon Kruger (1976), l'activité est localisée dans les parties externes du grain, c'est pourquoi en meunerie le son constitue la fraction de mouture la plus riche (Milner, 1951; Honold et Stahmann, 1968; Tikoo *et al.*, 1973), une très faible quantité passant dans la farine.

Longtemps en technologie le rôle des polyphénoloxydases a été confiné à leur intervention sur la couleur. C'est ainsi que Kobrehel *et al.* (1972) ont observé une corrélation entre l'indice de brun des semoules de blé dur et les activités peroxydasiques et polyphénoloxydasiques. Cependant, récemment Kuninori *et al.* (1976) ont étudié les effets rhéologiques de l'addition d'extraits aqueux de champignon à des pâtes de blé tendre. A l'aide de l'extensigraphe, ils observent un raffermissement de ces dernières, effet comparable à l'action d'un oxydant. Pour ces auteurs, le facteur responsable de l'oxydation des protéines du gluten est la polyphénoloxydase contenue dans les extraits de champignon. Ils proposent différents mécanismes d'action : l'un implique l'oxydation des esters de l'acide férulique liés aux pentosanes, contribuant ainsi à la formation d'un gel (Fausch *et al.*, 1963; Geismann et Neukom, 1973; Neukom et Markwalder, 1978), l'autre suppose l'oxydation des groupements tyrosyls des protéines conduisant à un changement de structure du gluten ou à des composés d'addition avec les thiols. Depuis, Kuninori *et al.* (1978), en utilisant des milieux modèles, ont montré que l'action de la polyphénoloxydase au cours du pétrissage conduit à l'oxydation des thiols ainsi qu'à des composés d'addition entre les thiols et les produits d'oxydation des résidus tyrosyls des protéines.

### *Les systèmes acide ascorbique oxydasique (E.C.1.10.3.3) et acide déhydroascorbique réductasique (E.C.1.8.5.1)*

Universellement utilisé en panification, l'acide ascorbique se comporte comme un oxydant, mais à l'inverse des autres oxydants chimiques la pâte est beaucoup plus tolérante à des surdosages (Milatovic, 1967; Feillet, 1967; Ponte, 1971). A la suite des travaux de Melville et Shattock (1938), Guillemet *et al.* (1942, 1943), Sandstedt et Hites (1945), Kuninori et Matsumoto (1963, 1964), Carter et Pace (1964, 1965) et Tsen (1964, 1965), un mécanisme d'action a été proposé par Tsen (1965) (fig. 3) pour expliquer l'effet de l'acide ascorbique sur les pâtes. Il semble aujourd'hui admis par la plupart des auteurs, au moins pour les méthodes conventionnelles de panification. Cependant, pour les méthodes en continu, où sont combinés l'action d'additifs oxydants et réducteurs et un apport d'énergie très important à la pâte, le mécanisme d'action de l'acide ascorbique

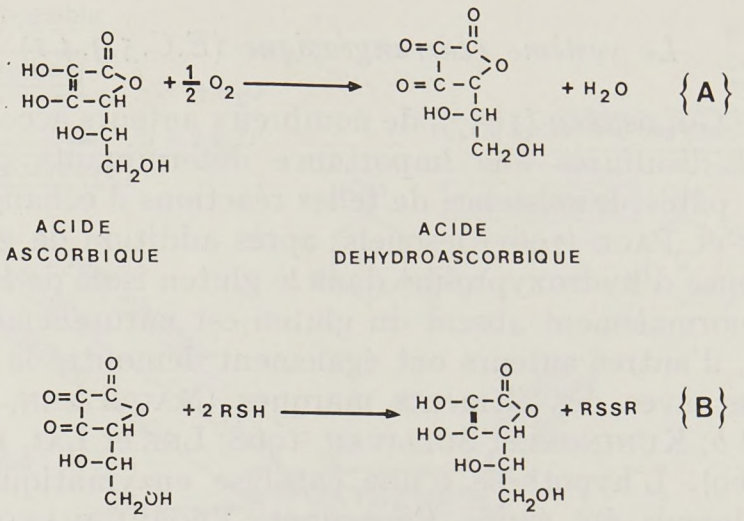



FIG. 3. — *Mécanisme d'action de l'acide ascorbique dans les pâtes proposé par* TSEN (*1965*)

semble être différent. ZENTNER (1968) suggère qu'il pourrait agir sur les liaisons hydrogène de la pâte. Observant des similitudes avec les phénomènes provoqués par d'autres antioxydants, DAHLE et MURTHY (1970) pensent plutôt que son action est due à ses propriétés antioxydantes donc protectrices vis-à-vis des lipides insaturés.

Quoi qu'il en soit, TSEN (1964, 1965) postule que les réactions A et B (fig. 3) sont catalysées par des enzymes. Suivant SANDSTEDT et HITES (1945), PROSKURYAKOV et AUERMAN (1959), MEREDITH (1965) et GRANT (1974), la première étape d'oxydation résulte de l'action d'une acide ascorbique oxydase présente dans la farine de blé. Cependant, à notre connaissance cette enzyme n'a jamais été isolée à partir du blé. En outre, ces mêmes auteurs, après des expériences de traitements thermiques préalables (SANDSTEDT et HITES, 1945, PROSKURYAKOV et AUERMAN, 1959) ou d'inhibition spécifique (MEREDITH, 1965), précisent qu'il existe certainement d'autres voies d'oxydation non négligeables qui ne sont pas catalysées par des enzymes. Enfin, de nombreux systèmes enzymatiques utilisent l'acide ascorbique comme cofacteur (ABBOTT et UDENFRIEND, 1974). Par ailleurs, il faut remarquer que la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique par des extraits aqueux de farine est négligeable (MILNER, 1951; HONOLD et STAHMANN, (1968), alors qu'elle est plus importante dans les suspensions de farine (PROSKURYAKOV et AUERMAN, 1959) et encore plus rapide dans les pâtes (KUNINORI et MATSUMOTO, 1963).

A l'opposé, une activité acide déhydroascorbique réductasique capable de catalyser la réaction B a été mise en évidence sans ambiguïté dans le blé (SANDSTEDT et HITES, 1945). Elle ne se manifeste qu'en présence de glutathion réduit (CARTER et PACE, 1965), la cystéine et l'acide thioglycolique n'ayant pas d'effet (KUNINORI et MATSUMOTO, 1964). Récemment, à partir de farine de blé, BOECK et GROSCH (1975) ont obtenu une préparation pure de GSH-DHA oxydoréductase et confirmé sa spécificité vis-à-vis du glutathion. Si ce système enzymatique constitue la voie principale de réduction de l'acide déhydroascorbique avec formation concomitante de ponts disulfures, son étroite spécificité d'action sur certains groupements thiols pourrait expliquer la tolérance des pâtes aux surdosages en acide ascorbique. En effet, tous les groupements thiols réagissant avec les oxydants chimiques tels que les iodates ou les bromates, ne seraient pas accessibles au système DHA réductase (TSEN, 1964) puisque non substrat de l'enzyme.

*Le système réarrangéasique (E.C.5.3.4.1)*

A la suite de GOLDSTEIN (1957), de nombreux auteurs accordent aux réactions d'échanges thiols-disulfures une importance déterminante pour les propriétés rhéologiques des pâtes. L'existence de telles réactions d'échanges a été démontrée par MCDERMOTT et PACE (1961) lesquels, après addition de gélatine thiolée, ont constaté la présence d'hydroxyproline dans le gluten isolé de la pâte après pétrissage. Ce résidu normalement absent du gluten est naturellement présent dans la gélatine. Depuis, d'autres auteurs ont également démontré la réalité de ces réactions, notamment avec des éléments marqués (MAURITZEN, 1967; REDMAN et EWART, 1967*a* et *b*; KUNINORI et SULLIVAN, 1968; LEE et LAI, 1968, 1969; MCDERMOTT *et al.*, 1969). L'hypothèse d'une catalyse enzymatique de ces réactions d'échanges n'a jamais été émise. Cependant, PROSKURYAKOV et ZUEVA (1963 et 1964), puis GORPINCHENKO *et al.* (1975) ont observé la présence dans le blé d'une protéine disulfure réductase (E.C.1.6.4.4.) NADPH dépendante. Récemment, GRYNBERG *et al.* (1977) ont mis en évidence une activité réarrangeasique dans l'embryon de blé. Cette activité, caractérisée par la réactivation de la ribonucléase dont les ponts disulfures ont été appariés de façon incorrecte, nécessite un cofacteur dialysable qui peut être remplacé par le glutathion réduit. L'optimum d'activité se situe à pH 7,8 et 35 °C (GRYNBERG *et al.*, 1978). GRYNBERG (1977) a mesuré l'activité enzymatique du germe et de l'albumen de différentes variétés de blé présentant des qualités boulangères très variables. Il note que les activités des germes sont comparables alors que celles des albumens des variétés possédant de bonnes qualités boulangères sont négligeables devant celles dont les qualités boulangères sont médiocres. Il attribue cette relation au fait que l'activité réarrangeasique, en favorisant les échanges entre les thiols et les disulfures, aboutit à une diminution de la cohésion du gluten. Étant donné la grande variété d'enzymes capables de catalyser ces échanges thiols-disulfures (FREEDMAN, 1979), il est probable que la réarrangease n'est pas la seule impliquée dans ces phénomènes.

## Conclusion

A la suite de cette étude bibliographique, nous pensons avoir montré l'abondance des réactions d'oxydoréduction mises en jeu lors de la maturation des farines et du pétrissage des pâtes ainsi que l'extrême complexité apportée par leurs nombreuses interrelations.

Une représentation globale des réactions catalysées permet de se rendre compte des interférences possibles entre les divers systèmes enzymatiques susceptibles d'intervenir (fig. 4). La lipoxygénase située à un véritable *carrefour*, catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés en hydroperoxydes avec apparition intermédiaire de radicaux libres très réactifs. Ces derniers sont capables de cooxyder un certain nombre de substances dont font partie les pigments liposolubles et les groupements thiols.

Les composés hématiniques, parmi lesquels on trouve les peroxydases et les catalases, catalysent également l'oxydation des lipides insaturés mais avec une spécificité beaucoup plus large et un pouvoir catalytique nettement inférieur à celui de la lipoxygénase (TAPPEL, 1961). En détruisant l'eau oxygénée, inhibitrice de cette dernière, la présence de ces deux enzymes favorisent l'action de la lipoxygénase.

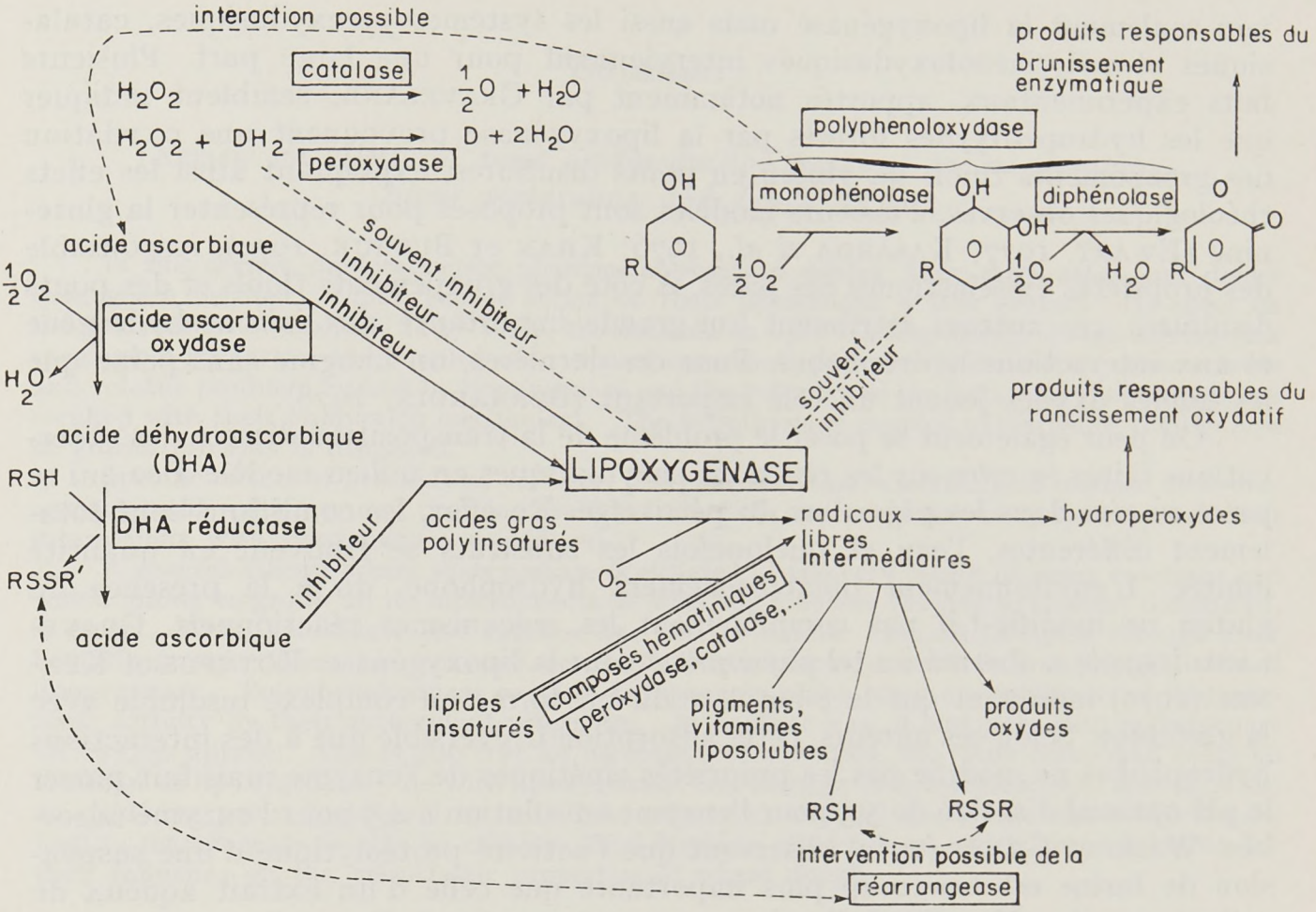



FIG. 4. — *Représentation schématique des différents systèmes d'oxydoréduction intervenant en technologie boulangère. Interrelations possibles entre ces systèmes.*

C'est aussi le cas des polyphénoloxydases qui oxydent les polyphénols lesquels par leurs propriétés antioxygènes sont inhibiteurs de l'activité lipoxygénasique (TAPPEL, 1961; NICOLAS et DRAPRON, 1977). Par contre, elles entrent en compétition avec la lipoxygénase pour la consommation d'oxygène.

A cette compétition participe également l'oxydation de l'acide ascorbique inhibiteur de la lipoxygénase (WALSH *et al.*, 1970; NICOLAS, 1978). La nature enzymatique de cette réaction n'est pas encore établie avec certitude. Par ailleurs, il existe dans la farine de blé une « acide déhydroascorbique réductase » capable de réduire l'acide déhydroascorbique en acide ascorbique en présence de glutathion réduit (GSH) lequel est oxydé (GSSG) avec formation d'un pont disulfure (KUNINORI et MATSUMOTO, 1964; CARTER et PACE, 1965; BOECK et GROSCH, 1976).

Enfin, la « réarrangease » possède un pouvoir catalytique sur les réactions d'échange entre les groupements thiols et disulfures (DE LORENZO *et al.*, 1966), celles-ci ayant une importance primordiale sur les propriétés rhéologiques des pâtes de farine (BLOKSMA, 1975).

Un certain nombre de résultats semble acquis dans le cas de la lipoxygénase : oxydation couplée des caroténoïdes, libération accrue de lipides au cours du pétrissage et effets rhéologiques particulièrement nets pour des apports d'énergie importants à la pâte. On peut cependant se demander dans quelle mesure les composés hématiniques, capables de catalyser des réactions semblables, contribuent à ces effets. Si les radicaux libres dont la formation au cours du pétrissage a été établie (DRONZEK et BUSHUK, 1968; NISHIYAMA *et al.*, 1978), ont une importance quelconque dans le développement des pâtes (AXFORD et ELTON, 1960), il est clair que

non seulement la lipoxygénase mais aussi les systèmes peroxydasiques, catalasiques et polyphénoloxydasiques interviennent pour une large part. Plusieurs faits expérimentaux, apportés notamment par GRAVELAND, semblent indiquer que les hydroperoxydes formés par la lipoxygénase provoquent une oxydation des groupements thiols du gluten en ponts disulfures, expliquant ainsi les effets rhéologiques observés. Plusieurs modèles sont proposés pour représenter la gluténine (EWART, 1977; KASARDA *et al.*, 1976; KHAN et BUSHUK, 1979), responsable des propriétés visoélastiques des pâtes. A côté des groupements thiols et des ponts disulfures, ces auteurs attribuent une grande importance aux liaisons hydrogène et aux interactions hydrophobes. Pour ces dernières, on imagine sans peine que les lipides oxydés jouent un rôle important (BERNARDIN, 1978).

On peut également se poser le problème de la transposition directe des observations faites *in vitro* sur les réactions enzymatiques en milieu modèle à ce qui se passe *in vivo* dans les pâtes lors du pétrissage. En effet, les conditions sont totalement différentes, l'eau et quelquefois les substrats se trouvent en quantité limitée. L'environnement inhabituellement hydrophobe, dû à la présence du gluten ne modifie-t-il pas complètement les mécanismes réactionnels. GRAVELAND (1970*b*) a observé un tel phénomène pour la lipoxygénase. ROTHFUS et KENNEL (1970) indiquent que la β-amylase du blé forme un complexe insoluble avec la gluténine. Selon ces auteurs, cette adsorption irréversible due à des interactions hydrophobes ne modifie pas les propriétés cinétiques de l'enzyme mais fait passer le pH optimal d'action de 5,5 pour l'enzyme en solution à 4,5 pour l'enzyme adsorbée. WANG et GRANT (1969) observent que l'activité protéolytique d'une suspension de farine est beaucoup plus importante que celle d'un extrait aqueux de cette farine, le pH optimal d'action passant de 4,4 à 3,8. Ils attribuent ces résultats à des interactions avec les protéines insolubles de la farine. Ces observations doivent être rapprochées de celles effectuées pour l'oxydation de l'acide ascorbique dont la vitesse va croissante lorsque l'on passe d'un extrait à une suspension puis à une pâte de farine (PROSKURYAKOV et AUERMAN, 1959; KUNINORI et MATSUMOTO, 1963). On peut penser qu'une étude plus systématique de l'influence des protéines du gluten sur les réactions enzymatiques apporterait des enseignements précieux sur les phénomènes observés au cours du pétrissage.

Enfin, très peu d'études ont porté sur la stabilité des activités enzymatiques au cours du stockage (FREIMUTH *et al.*, 1972; COLAS et CHARGELÈGUE, 1974) et sur leur thermosensibilité (WALLACE et WHEELER, 1972) dans les produits de mouture. Il est certain qu'une étude plus approfondie de leur stabilité dans leurs milieux naturels permettrait au technologue de mieux maîtriser leurs influences au cours de la maturation des farines et du pétrissage des pâtes.

*Reçu pour publication en décembre 1979.*

## Remerciements

Je tiens à remercier M. R. DRAPRON, Ingénieur au Laboratoire de Technologie Alimentaire de l'I.N.R.A.

Les nombreuses discussions et échanges d'idées que nous avons eus ont grandement facilité cette mise au point.

## Summary

*Review on effects of some oxidoreduction enzymes in breadmaking. Flour maturation and dough mixing*

In this review, oxidoreduction phenomena observed during flour maturation and dough mixing are recalled. Lipoxygenase action on these phenomena is first evoked. Its effect on the destruction of essential fatty acids, the decrease in lipid binding during dough mixing, the rheological properties and coupled oxidation of carotenoid pigments is described. Non volatile and volatile products formed by lipoxygenase and the influence of the latter on crumb aroma are recalled with their production mechanism. The hypothesis of coupled oxidation of thiol groups of gluten proteins is discussed.

Specific effects of peroxidase, catalase, polyphenoloxidase, ascorbic acid oxidase, dehydroascorbic acid reductase and protein disulfide isomerase (rearrangease) are presented and their interactions with lipoxygenase considered.

A general scheme where lipoxygenase is situated at the very center of many reactions and which allows to group all its interconnections with the different enzymatic systems considered, is given. Thus, peroxidase and catalase are able to oxidize insaturated lipids through their hematin group. These two enzymes act on hydrogen peroxide which is a strong inhibitor of lipoxygenase. Polyphenoloxidase oxidizes polyphenols which often are inhibitors of lipoxygenasic activity by their antioxidant properties. In another way, it competes with lipoxygenase for oxygen uptake. This is also true for ascorbic acid oxidation, the latter compound being an inhibitor of lipoxygenase. As with lipoxygenase, one ascribes to dehydroascorbic acid (D.H.A.) an oxidizing power (catalyzed by a D.H.A. reductase) on thiol groups giving disulfide bonds. Lastly, rearrangease is able to catalyse thiol-disulfide interchanges which are well-known for their influence on the viscoelastic properties of wheat dough.



Key words

*Breadmaking, maturation, mixing, enzymes, lipoxygenase, peroxidase, catalase, polyphenoloxidase, ascorbic acid oxidase, dehydroascorbic acid reductase, rearrangease*


## Références bibliographiques


ABBOTT M. T., UDENFRIEND S., 1974. α-ketoglutarate-coupled dioxygenases. *In* " Molecular mechanisms of oxygen activation ", Ed. HAYAISHI O., chap. 5, 167-214, Ac. Press, New-York.

ARENS D., SEILMEIER W., WEBER F., KLOOS G., GROSCH W., 1973. Purification and properties of a carotene co-oxidizing lipoxygenase from peas. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 295-305.

AXELROD B., 1974. Lipoxygenases. *In* " Food related enzymes ". *Advances in Chemistry Series*, Vol. 136, Chap. 13, 324-348, Ed. WHITAKER J. R., *Am. Chem. Soc.*, Washington.

AXFORD D. W. E., ELTON G. A. H., 1960. The mechanical development of bread doughs. *Chem. Ind.* (London), 1257.

BAILEY C. H., JOHNSON A. H., 1924. Studies on wheat flour grades. 4. Changes in hydrogen ion concentration and electrolytic resistance of water extracts of natural and chlorine-treated flour in storage. *Cereal Chem.*, **1**, 133-137.

BALLAND A., 1904. Sur la conservation des farines par le froid. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **139** 822-823.

BEAUX Y., 1970. Le lipoxygénase de la fève (*Vicia faba* L.). Isolement et caractéristiques. Répercussions de son action en technologie boulangère. *Thèse de Docteur-Ingénieur*, Paris n° C.N.R.S. A.O. 4554.

BELLENGER P., GODON B., 1972. Étude préliminaire de la maturation des farines de blé. Influence de l'aération sur l'évolution de diverses caractéristiques biochimiques et physico-chimiques. *Ann. Technol. Agric.*, **21**, 145-161.

BENGTSSON B. L., BOSUND I., RASMUSSEN I., 1967. Hexanal and ethanol formation in peas in relation to off-flavor development. *Food. Technol.*, **21**, 478-482.

Bernardin J. E., 1978. Gluten protein interaction with small molecules and ions — the control of flour properties. *Bakers Dig.*, **52**, 4, 20-23.

Bertrand G., Muttermilch W., 1907. Sur l'existence d'une tyrosinase dans le son de froment. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **144**, 1285-1288.

Blain J. A., Todd J. P., 1955. The lipoxidase activity of wheat. *J. Sci. Fd. Agric.*, **6**, 471-479.

Blain J. A., Styles E. C. C., 1959. A lipoperoxidase factor in soya extracts. *Nature*, **184**, 1141.

Blish M. J., Bode C. E., 1935. Catalase activity in wheat flour. *Cereal Chem.*, **12**, 133-142.

Bloksma A. H., 1968. Oxidation by molecular oxygen of thiol groups in unleavened doughs from normal and defatted wheat flours. *J. Sci. Fd. Agric.*, **14**, 529-535.

Bloksma A. H., 1971. Rheology and chemistry of dough. *In* " Wheat chemistry and technology " 2nd. Ed., Chap. 11, 523-584, Ed. Pomeranz Y., *Am. Assoc. Cer. Chem.*, Saint-Paul.

Bloksma A. H., 1975. Thiol and disulfide groups in dough rheology. *Cereal Chem.*, **52**, 170r-183r.

Boeck D., Grosch W., 1978. Glutathion-Dehydrogenase (E.C.1.8.5.1) aus Weizenmehl. Reidarstellung und Eigenschaften. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **162**, 243-251.

Carter J. E., Pace J., 1964. Distribution of dehydroascorbic acid reductase in the wheat grain. *Nature*, **201**, 503.

Carter J. E., Pace J., 1965. Some interrelationships of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in the presence of flour suspensions and in dough. *Cereal Chem.*, **42**, 201-208.

Chargelegue A., 1974. Lipoxygénase et pain français. Influence de la lipoxygénase *in situ* et purifiée en panification. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 375-384.

Christianson D. D., Gardner H. W., 1975. Substitution reactions of linoleic acid hydroperoxide isomerase. *Lipids*, **10**, 448-453.

Christopher J., Pistorius E. K., Axelrod B., 1970. Isolation of an isozyme of soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 12-19.

Christopher J., Pistorius E. K., Regnier F. F., Axelrod B., 1972. Factors influencing the positionnal specificity of soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 82-87.

Chung O. K., Tsen C. C., 1975. Changes in lipid binding and distribution during dough mixing. *Cereal Chem.*, **52**, 533-548.

Colas A., Chargelègue A., 1974. Activités lipasique et lipoxygénasique des blés et produits de mouture. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 323-334.

Cosgrove D. J., 1956. The absorption of oxygen from air by flour batters: changes in the rate of uptake due to aging of the flour. *J. Sci. Fd. Agric.*, **7**, 668-672.

Cuendet L. S., Larson E., Norris C. G., Geddes W. F., 1954. The influence of moisture content and other factors on the stability of wheat flours at 37,8 °C. *Cereal Chem.*, **31**, 362-389.

Dahle L. K., Murthy P. R., 1970. Some effects of antioxidants in dough systems. *Cereal Chem.*, **47**, 296-303.

Daniels N. W. R., Richmond J. W., Russell Eggitt P. W., Coppock J. B. M., 1966. Studies on the lipids of flour. 3. Lipid binding in breadmaking. *J. Sci. Fd. Agric.*, **17**, 20-29.

Daniels N. W. R., Wood P. S., Russell Eggitt P. W., Coppock J. B. M., 1970. Studies on the lipids of flour. 5. Effect of air on lipid binding. *J. Sci. Fd. Agric.*, **21**, 377-384.

Daniels N. W. R., 1975. Some effects of water in wheat flour doughs. *In* " Water relations of foods ", Ed. Duckworth R. B., 573-588, Ac. Press, London.

de Lorenzo F., Goldberger R. F., Steers E., Givol D., Anfinsen C. S., 1966. Purification and properties of an enzyme from beef liver which catalyzes sulfhydryl-disulphide interchange in proteins. *J. Biol. Chem.*, **241**, 1562-1567.

Dempster C. J., Hlynka I., Anderson J. A., 1954. Extensograph studies of the improving action of oxygen in dough. *Cereal Chem.*, **31**, 240-249.

Drapron R., Uzzan A., 1968. Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. *Ann. Nutr. Alim.*, **22**, 393-436.

Drapron R., Beaux Y., 1969. Sur l'oxydation des acides gras essentiels par la lipoxygénase en panification et la formation de composés volatils intervenant dans l'arôme du pain. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **268**, 2598-2601.

Drapron R., Beaux Y., Cormier M., Geffroy J., 1971. Sur l'oxydation enzymatique des tocophérols et des pigments caroténoïdes au cours de la panification. *Compt. Rend. Acad. Agric. Fr.*, février 1971, 245-251.

Drapron R., 1972. Réactions enzymatiques en milieu peu hydraté. *Ann. Technol. Agric.*, **21**, 487-499.

DRAPRON R., BEAUX Y., CORMIER M., GEFFROY J., ADRIAN J., 1974. Répercussions de l'action de la lipoxygénase en panification. Destruction des acides gras essentiels à l'état libre, des caroténoïdes et des tocophérols, altération du goût du pain. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 353-365.

DRONZEK B., BUSHUK W., 1968. A note on the formation of free radicals in dough during mixing. *Cereal Chem.*, **45**, 286.

EGMOND M. R., FINAZZI-AGRO A., FASELLA P. M., VELDINK G. A., VLIEGENTHART J. F. G., 1975. Changes in the fluorescence and absorbance of lipoxygenase induced by 13$L_s$-hydroperoxylinoleic acid and linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 43-49.

ESKIN N. A. M., GROSSMAN S., PINSKY A., 1977. Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. *Crit. Rev. Fd. Sci. Nutr.*, **9**, 1-40.

ÉTIENNE J. J., DUBOIS M., 1974. Répercussions de l'action de la lipoxygénase de la fève sur les caractéristiques des pâtes et du pain. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 335-351.

EVANS J. J., MECHAM D. K., 1971. Occurence and properties of peroxidase isozymes in wheat flour and milling fractions. *Cereal Sci. Today*, **16**, Abstract n° 22.

EWART J. A. D., 1977. Re-examination of the linear glutenin hypothesis. *J. Sci. Fd. Agric.*, **28**, 191-199.

FAUSCH H., KÜNDIG W., NEUKOM H., 1963. Ferulic acid as a component of a glycoprotein from wheat flour. *Nature*, **198**, 287.

FEILLET P., 1967. L'acide ascorbique, agent améliorant des farines. *Bull. Ec. Fr. Meunerie*, **219**, 117-121.

FIFIELD C. C., BAILEY C. H., 1929. The march of acidity in stored flour. *Cereal Chem.*, **6**, 133-137.

FRAZIER P. J., LEIGH DUGMORE F. A., DANIELS N. W. R., RUSSELL EGGITT P. W., COPPOCK J. B. M., 1973. The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of wheat flour doughs. *J. Sci. Fd. Agric.*, **24**, 421-436.

FRAZIER P. J., BRIMBLECOMBE F. A., DANIELS N. W. R., RUSSELL EGGITT P. W., 1977. The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of doughs from fat-extracted and reconstituted wheat flour. *J. Sci. Fd. Agric.*, **28**, 247-254.

FREEDMAN R. B., 1979. How many enzymes are responsible for the several cellular processes involving thiol: protein-disulfide interchange? *FEBS Letters*, **97**, 201-210.

FREIMUTH U., LUDWIG E., HEINIG R., GEBHARDT E., 1972. Das Verhalten der Lipoxygenase und der Peroxidase in Weizenmehlen und teigen. *Die Nahrung*, **16**, 149-156.

GARDNER H. W., KLEIMAN R., WEISLEDER D., 1974. Homolytic decomposition of linoleic acid hydroperoxide: identification of fatty acid products. *Lipids*, **9**, 696-706.

GARDNER H. W., KLEIMAN R., WEISLEDER D., INGLETT C. E., 1977. Cysteine adds to lipid hydroperoxide. *Lipids*, **12**, 655-660.

GARDNER H. W., WEISLEDER D., KLEIMAN R., 1978. Formation of trans-12,13-epoxy-9-hydroperoxy-trans-10-octadecenoic acid from 13-L-hydroperoxy-cis-9,trans,-11-octadecadienoic acid catalyzed by either a soybean extract or cysteine-$FeCl_3$. *Lipids*, **13**, 246-252.

GEISSMANN T., NEUKOM H., 1973. On the composition of the water soluble wheat flour pentosans and their oxidative gelation. *Lebensm. Wissen. Technol.*, **6**, 59-62.

GOLDSTEIN S., 1957. Sulfhydryl und Disulfidgruppen der Klebereiweisse und ihre Beziehung zur Backfähigkeit der Brotmehle. *Mitt. Lebensm. Hyg. Bern.*, **48**, 87-93.

GORPINCHENKO T. V., VAKAR A. B., KRETOVICH V. L., 1975. Investigation of wheat protein disulfide reductase. *Biochemistry (URSS)*, **40**, 2, 323-330.

GRACZA R., 1965. Aging and storage studies in flours and air classified flour fractions. *Cereal Chem.*, **42**, 333-358.

GRANT D. R., 1974. Studies of the role of ascorbic acid in chemical dough development. 1. Reaction of ascorbic acid with flour-water suspensions. *Cereal Chem.*, **51**, 684-692.

GRAVELAND A., 1968. Combination of thin layer chromatography and gas chromatography in the analysis on a microgram scale of lipids from wheat flour and wheat flour doughs. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 834-840.

GRAVELAND A., 1970*a*. Enzymatic oxidations of linoleic acid and glycerol-1-monolinoleate in doughs and flour-water suspensions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **47**, 352-361.

GRAVELAND A., 1970*b*. Modification of the course of the reaction between wheat flour lipoxygenase and linoleic acid due to adsorption of lipoxygenase on glutenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 427-434.

GRAVELAND A., 1971. Modification of the lipoxygenase reaction by wheat glutenin. *Thèse Doctorat*, Université Utrecht.

GRAVELAND A., 1973*a*. Analysis of lipoxygenase non volatile reaction products of linoleic acid in aqueous cereal suspensions by urea extraction and gas chromatography. *Lipids*, **8**, 599-605.

GRAVELAND A., 1973*b*. Enzymatic oxidation of linoleic acid in aqueous wheat flour suspensions. *Lipids*, **8**, 606-611.

GRAVELAND A., BOSVELD P., MARSEILLE J. P., 1978. Determination of thiol groups and disulfide bonds in wheat flour and dough. *J. Sci. Fd. Agric.*, **29**, 53-61.

GREER E. N., JONES C. R., MORAN T., 1954. The quality of flours stored for periods up to 27 years. *Cereal Chem.*, **31**, 439-450.

GROSCH W., HOXER B., STAN H. J., SCHORMULLER J., 1972. Reindarstellung eines lipoxygenase / GLO-Komplexes aus Sojabohnen und Zerlegung in Untereinheiten. *Fette Seifen Anstrichm.*, **74**, 16-20.

GROSCH W., LASKAWY G., KAISER P., 1977. Co-oxydation von β-Carotin und Canthaxanthin durch gerinigte Lipoxygenasen aus Sojabohnen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **165**, 77-81.

GRYNBERG A., 1977. Mise en évidence d'une protéine disulfure isomérase (E.C.5.3.4.1) dans le grain de blé. Étude de quelques caractéristiques et incidence éventuelles en technologie de la panification. *Thèse de Docteur 3e cycle*, Univ. Paris 7-ENSIA.

GRYNBERG A., NICOLAS J., DRAPRON R., 1977. De la présence d'une protéine disulfure isomérase (E.C.5.3.4.1) dans l'embryon de blé. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris Série D*, **284**, 235-238.

GRYNBERG A., NICOLAS J., DRAPRON R., 1978. Some characteristics of protein disulfide isomerase (E.C.5.3.4.1) from wheat (Triticum vulgare) embryo. *Biochimie*, **60**, 547-551.

GUILLEMET P., SONNTAG G., HAMEL P., 1942. Le système oxydasique de la farine de blé et l'action de l'acide ascorbique et de la pulpe de betterave dans la pâte boulangère. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **214**, 720-722.

GUILLEMET R., SONNTAG G., 1943. L'action des oxydants sur les protéides de la farine de blé. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **216**, 420-422.

GUSS P. L., RICHARDSON T., STAHMANN M. A., 1968. Oxidation of various lipid substrates with unfractionated soybean wheat lipoxidase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 272-276.

HAAS L. W., BOHN R. M., 1934. Bleaching bread dough. *Chem. Abstr.*, **28**, 4137. U.S. Patents 1957333-4-5-6-7.

HAMBERG M., 1971. Steric analysis of hydroperoxides formed by lipoxygenase oxygenation of linoleic acid. *Anal. Biochem.*, **43**, 515-526.

HAWTHORN J., TODD J. P., 1955*a*. Catalase in relation to the unsaturated-fat oxidase activity of wheat flour. *Chem. Ind.* (London), 446-447.

HAWTHORN J., TODD J. P., 1955*b*. Some effects of oxygen on the mixing of bread doughs. *J. Sci. Fd. Agric.*, **6**, 501-511.

HAWTHORN J., 1961. Oxygen in the mixing of bread doughs. *Bakers Dig.*, **35**, 34-43.

HEIMANN W., DRESEN P., 1973. Uber den enzymatischen Hydroperoxidabbau in Cerealien. Enzymcharakterisierung und Reaktionprodukte. *Helv. Chim. Acta*, **56**, 463-469.

HEIMANN W., DRESEN P., SCHREIER P., 1973. Uber das Lipoxygenase —" Lipoperoxidase "— System in Cerealien. Abtrennung von zwei Proteinkomplexen Lipoxygenase und Linolsäure hydroperoxid-Abbau-Aktivität aus Hafer und Sojabohnen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **152**, 147-151.

HIRD F. J. R., YATES J. R., 1961. The oxidation of protein thiol groups by iodate, bromate and persulphate. *Biochem. J.*, **80**, 612-616.

HONOLD G. R., STAHMANN M. A., 1968. The oxidation-reduction enzymes of wheat. 4. Qualitative and quantitative investigations of oxidases. *Cereal Chem.*, **45**, 99-108.

IRVINE G. N., WINKLER C. A., 1950. Factors affecting the color of macaroni. 2. Kinetic studies of pigment destruction during mixing. *Cereal Chem.*, **27**, 205-218.

IRVINE G. N., BUSHUK W., ANDERSON J. A., 1954*a*. Kinetic studies of the catalase system of wheat. *Cereal Chem.*, **31**, 256-266.

IRVINE G. N., BUSHUK W., ANDERSON J. A., 1954*b*. A note on the catalase activity of North american wheats. *Cereal Chem.*, **31**, 267-270.

JEANJEAN M. F., KOBREHEL K., FEILLET P., 1975. Purification et caractérisation de deux peroxydases de blé dur. *Biochimie*, **57**, 145-153.

KASARDA D. D., BERNARDIN J. E., NIMMO C. C., 1978. Wheat proteins. *In* " Advances in cereal science and technology ", vol. 1, 158-236, Ed. POMERANZ Y., *Am. Assoc. Cer. Chem.*, Saint-Paul.

KHAN K., BUSHUK W., 1979. Studies of glutenin. 12. Comparison of sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedures. *Cereal Chem.*, **56**, 63-68.

KIES M. W., HAINING J. L., PISTORIUS E. K., SCHRŒDER D. H., AXELROD B., 1969. On the question of the identity of soybean lipoxidase and carotene oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 312-315.

KOBREHEL K., LAIGNELET B., FEILLET P., 1972. Relation entre les activités peroxydasiques et polyphénoloxydasiques des blés durs et le brunissement des pâtes alimentaires. *Compt. Rend. Acad. Agric. Fr.*, 1099-1106.

KOCH R. B., 1956. Mechanisms of fat oxidation. *Bakers Dig.*, **30**, 2, 48-71.

KOCH R. B., STERN B., FERRARI C. G., 1958. Linoleic acid and trilinolein as substrates for soybean lipoxidase(s). *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 165-179.

KRUGER J. E., LABERGE D. E., 1974. Changes in peroxidase activity and peroxidase isozyme patterns of wheat during kernel growth and maturation. *Cereal Chem.*, **51**, 345-354.

KRUGER J. E., 1976. Changes in the polyphenoloxidases of wheat during kernel growth and maturation. *Cereal Chem.*, **53**, 201-213.

KRUGER J. E., 1977. Changes in the catalases of wheat during kernel growth and maturation. *Cereal Chem.*, **54**, 820-826.

KUNINORI T., MATSUMOTO H., 1963. L-ascorbic acid oxidizing system in dough and dough improvement. *Cereal Chem.* **40**, 647-657.

KUNINORI T., MATSUMOTO H., 1964. Dehydro-L-ascorbic acid reducing system in flour. *Cereal Chem.*, **41**, 39-46.

KUNINORI T., SULLIVAN B., 1968. Disulfide-sulfhydryl interchange studies of wheat flour. 2. Reaction with glutathione. *Cereal Chem.*, **45**, 486-495.

KUNINORI T., NISHIYAMA J., MATSUMOTO H., 1976. Effect of mushroom extract on the physical properties of dough. *Cereal Chem.* **53**, 420-428.

KUNINORI T., NISHIYAMA J., MATSUMOTO H., 1978. The effect of mushroom tyrosinase on the physical properties of dough and gluten. 3. *Cereal Foods World*, **28**, 500 (Abstract n° A7-7).

LAIGNELET B., KOBREHEL K., FEILLET P., 1972. Le problème de la coloration des pâtes alimentaires. *Ind. Agric. Alim.*, **27**, 695-713.

LAIGNELET B., 1979. Étude de certains facteurs biochimiques communs à la coloration et à la qualité culinaire des pâtes alimentaires de blé dur. *Thèse Doctorat d'État*, Université de Montpellier.

LEE C. C., LAI T. S., 1968. Studies with radioactive tracers. 14. A note on the disulfide sulfhydryls interchange in doughs made with $^{35}S$-labelled flour. *Cereal Chem.*, **45**, 627-630.

LEE C. C., LAI T. S., 1969. Studies with radioactive tracers. 15. Some observations on the sulfhydryl groups in dough. *Cereal Chem.*, **46**, 598-606.

LOEB J., 1930. Étude de phénomènes diastasiques dans les farines de froment et contribution à l'étude de la fermentation panaire. *Thèse d'Université*, Strasbourg, cité par BELLENGER et GODON, 1972.

LOURY M., FORNEY M., 1968. Étude de l'autoxydation de l'acide linoléique aux températures de 20 °C et 40 °C. 2. Partie théorique. *Rev. Fr. Corps Gras*, **15**, 663-673.

MANN D. L., MORRISSON W. R., 1974. Changes in wheat lipids during mixing and resting of flour water doughs. *J. Sci. Fd. Agric.*, **25**, 1109-1119.

MANN D. L., MORRISSON W. R., 1975. Effects of ingredients on the oxidation of linoleic acid by lipoxygenase in bread doughs. *J. Sci. Fd. Agric.*, **26**, 493-505.

MAPSON L. W., MOUSTAFA E. M., 1955. The oxidation of glutathione by a lipoxidase enzyme from pea seeds. *Biochem. J.*, **60**, 71-80.

MARKWALDER H. U., SCHEFFELDT P., NEUKOM H., 1975. Oxidation of linoleic acid by lipoxygenase in flour water systems: isolation of 9, 12, 13-trihydroxy-trans-10-octadecenoic acid as a main reaction product. *Lebensm. Wissen. Technol.*, **8**, 234-235.

MATSUMOTO H., HLYNKA I., 1959. Some aspects of the sulfhydryl-disulfide system in flour and dough. *Cereal Chem.*, **36**, 513-521.

MATSUO R. R., BRADLEY J. W., IRVINE G. N., 1970. Studies on pigment destruction during spaghetti processing. *Cereal Chem.*, **47**, 1-5.

MAURITZEN C. M., 1967. The incorporation of cysteine-$^{35}S$, cystine-$^{35}S$, and N-ethyl-maleimide-$^{14}C$ into doughs made from wheat flour. *Cereal Chem.*, **44**, 170-182.

MCDERMOTT E. E., PACE J., 1961. Modification of the properties of flour protein by thiolated gelatin. *Natur*, **192**, 657.

MCDERMOTT E. E., STEVENS D. J., PACE J., 1969. Modifications of flour proteins by disulphide interchange reactions. *J. Sci. Fd. Agric.*, **20**, 213-217.

MECHAM D. K., KNAPP C., 1966. The sulfhydryl content of dough mixed under nitrogen. *Cereal Chem.*, **43**, 226-236.

MELVILLE J., SHATTOCK H. T., 1938. The action of ascorbic acid as a bread improver. *Cereal Chem.*, **15**, 201-205.

MEREDITH P., 1965. The oxidation of ascorbic acid and its improver effect in bread doughs. *J. Sci. Fd. Agric.*, **16**, 474-480.

MILATOVIC L., 1967. La vitamina C nella tecnologia dei cereali. Ed. Tecnica molitoria, Pinerolo.

MILLER B. S., KUMMEROW F. A., 1948. The disposition of lipase and lipoxidase in baking and the effect of their reaction products on consumer acceptability. *Cereal Chem.*, **25**, 391-398.

MILNER M., 1951. A titration method for the determination of catechol oxidase activity in dry plant tissues. *Cereal Chem.* **28**, 435-448.

MILNER M., GOULD M. R., 1951. The quantitative determination of phenol oxidase activity in wheat varieties. *Cereal Chem.*, **28**, 473-478.

MITSUDA H., YASUMOTO K., YAMAMOTO A., 1967. Inactivation of lipoxygenase by hydrogen peroxide, cysteine and some others reagents. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 853-860.

MORRISON W. R., 1963. The free fatty acids of wheat flour : their role in simple flour-water mixtures. *J. Sci. Fd. Agric.*, **14**, 245-251.

MORRISON W. R., MANEELY E. A., 1969. Importance of wheat lipoxidase in the oxidation of free fatty acid in flour-water systems. *J. Sci. Fd. Agric.*, **20**, 379-381.

MORRISON W. R., PANPAPRAI R., 1975. Oxidation of free and esterified linoleic and linolenic acids in bread doughs by wheat and soya lipoxygenases. *J. Sci. Fd. Agric.*, **26**, 1225-1236.

NEUKOM H., MARKWALDER H. U., 1978. Oxidative gelation of wheat flour pentosans: a new way of crosslinking polymers. *Cereal Foods World*, **23**, 374-376.

NICOLAS J., DRAPRON R., 1977. Nordihydroguaiareric acid and butylated hydroxytoluene as inhibitors of purified lipoxygenase from horse bean (*Vicia faba* L.). *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **54**, 284-288.

NICOLAS J., 1978. Effets de différents paramètres sur la destruction des pigments caroténoïdes de la farine de blé tendre au cours du pétrissage. *Ann. Technol. Agric.*, **27**, 695-713.

NICOLAS J., LAUNAY B., ROUSSEL P., DRAPRON R., 1978. Influence de la composition et du repos sur la destruction des pigments caroténoïdes et les propriétés viscoélastiques des pâtes de farine de blé tendre. *Bull. Ec. Fr. Meunerie*, **287**, 247-282.

NISHIYAMA J., KUNINORI T., MATSUMOTO H., 1978. The use of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl for detecting free radicals in wheat flour dough. *J. Sci. Fd. Agric.*, **29**, 267-273.

POISSON J., BÈGUE D., BOURBON G., 1957. Conservation de la qualité des farines. Évolution des caractères technologiques des farines conservées en cellules étanches en fonction de la température et de la teneur en eau. *Meunerie Fr.*, **127**, 21-34.

POMERANZ Y., TAO R. P. C., HOSENEY R. C., SHOGREN M. D., FINNEY K. F., 1968. Evaluation of factors affecting lipid binding in wheat flours. *J. Sci. Fd. Agric.*, **16**, 974-978.

POMERANZ Y., 1971. Composition and functionality of wheat-flour components. *In* " Wheat chemistry and technology " 2nd. Ed., Ed. POMERANZ Y., Chap. 12, 585-674. *Am. Ass. Cer. Chem.*, Saint-Paul.

PONTE J. G., 1971. Bread. *In* " Wheat chemistry and technology " 2nd Ed., Ed. POMERANZ Y., Chap. 13, 675-742. *Am. Ass. Cer. Chem.*, Saint-Paul.

PRATT D. B., 1971. Criteria of flour quality. *In* " Wheat chemistry and technology " 2nd Ed., Ed. POMERANZ Y., Chap. 5, 201-226. *Am. Ass. Cer. Chem.*, Saint-Paul.

PROSKURYAKOV N. I., ZUEVA E. S., 1963. Participation of reductases in the reduction of disulfide compounds in wheat flour. *Biokhimiya*, **28**, 254-257.

PROSKURYAKOV N. I., AUERMAN T. L., 1959. Oxidation of ascorbic acid by oxidase system of wheat flour. *Biokhimiya*, **24**, 297-302.

PROSKURYAKOV N. I., ZUEVA E. S., 1964. Enzymatic reduction of disulfide bonds of proteins and low molecular components of wheat flour. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **158**, 232-234.

RAMADOSS C. S., PISTORIUS E. K., AXELROD B., 1978. Coupled oxidation of carotene by lipoxygenase requires two isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 549-552.

RAO V. S., VAKIL U. K., SREENIVASAN A., 1978. Comparative studies on physiochemical and baking properties of newly harvested and stored indian varieties of wheat. *J. Sci. Fd Agric.*, **29**, 155-164.

REDMAN D. G., EWART J. A., 1967*a*. Disulphide interchange in dough proteins. *J. Sci. Fd Agric.*, **18**, 15-18.

REDMAN D. G., EWART J. A., 1967*b*. Disulphide interchange in cereal proteins. *J. Sci. Fd Agric.*, **18**, 520-523.

REED G., 1966. Enzymes in food processing. Ac. Press, New-York.

ROTHFUS J. A., KENNEL S. J., 1970. Properties of wheat β-amylase adsorbed on glutenin. *Cereal Chem.*, **47**, 140-146.

SANDSTEDT R. M., HITES B. D., 1945. Ascorbic acid and some related compounds as oxidizing agents in doughs. *Cereal Chem.*, **22**, 161-187.

SEQUI P., MARCHESINI A., LANZANI G. A., 1968. A study on isolation and purification of wheat germ isoperoxidases. *Atti VII Simp. Int. Agrochim.*, **13**, 75-80.

SHARP A. F., 1924. Wheat and flour studies. 2. Aging 1. The change in hydrogen ion concentration of wheat and mill products with age. *Cereal Chem.*, **1**, 117-132.

SHIN M., NAKAMURA W., 1961. Hemoproteins of wheat germ. 3. Further studies on purification of peroxidase and some of theirs properties. *J. Biochem.* (Tokyo), **50**, 500-507.

SMITH D. E., ANDREWS J. S., 1957. The uptake of oxygen by flour doughs. *Cereal Chem.*, **34**, 323-336.

SMITH D. E., VAN BUREN J. P., ANDREWS J. S., 1957. Some effects of oxygen upon the physical and chemical properties of flour doughs. *Cereal Chem.*, **34**, 337-349.

SOKOL H. A., MECHAM D. K., PENCE J. W., 1960. Sulfhydryl losses during mixing of doughs. Comparison of flours having different mixing characteristics. *Cereal Chem.*, **37**, 739-748.

STAHMANN M. A., 1977. Crosslinking of protein by peroxidase *In* " Protein crosslinking. Nutritionnal and medical consequences ". *Adv. Exp. Med. Biol.*, Vol. 86B, Ed. FRIEDMAN M., Plenum Pr., New-York.

SULLIVAN B., HOWE M., 1933. Lipases of wheat. 1. *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 320-324.

SULLIVAN B., DAHLE L., NELSON O. R., 1961. The oxidation of wheat flour. 2. Effect of sulfhydryl-blocking agent. *Cereal Chem.*, **38**, 281-291.

SUMNER J. B., SUMNER R. J., 1940. The coupled oxidation of carotene and fat by carotene oxidase. *J. Biol. Chem.*, **134**, 531-533.

TANEJA S. R., ABROL Y. P., SACHAR R. C., 1974. Modulation of o-diphenolase and monophenolase enzymes during wheat grain development. *Cereal Chem.*, **51**, 457-465.

TAPPEL A. L., 1961. Biocatalysts: Lipoxidase and hematin compounds. *In* " Autoxidation and antioxidants ", Ed. LUNDBERG W. O., Chap. 9, 325-366, Interscience Publis., New-York.

TIKOO S., SINGH J. P., ABROL Y. P., SACHAR R. C., 1973. Studies on polyphenoloxidase in wheat grains. *Cereal Chem.*, **50**, 520-528.

TSEN C. C., HLYNKA I., 1962. The role of lipids in oxidation of doughs. *Cereal Chem.*, **39**, 209-219.

TSEN C. C., DEMPSTER C. J., 1963. Changes in sulfhydryl groups of flour during storage. *Cereal Chem.*, **40**, 586-589.

TSEN C. C, HLYNKA I., 1963. Flour lipids and oxidation of sulfhydryl groups in dough. *Cereal Chem.*, **40**, 145-153.

TSEN C. C., 1964. Ascorbic acid as a flour improver. *Bakers Dig.*, **38**, 44-47.

TSEN C. C., BUSHUK W., 1963. Changes in sulfhydryl and disulfide contents of doughs during mixing under various conditions. *Cereal Chem.*, **40**, 399-408.

TSEN C. C., 1965. The improving mechanism of ascorbic acid. *Cereal Chem.*, **42**, 86-96.

VELDINK G. A., GARSSEN G. J., VLIEGENTHART J. F. G., BOLDINGH J., 1972. Positionnal specificity of corn germ lipoxygenase as a function of pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 22-26.

VELDINK G. A., VLIEGENTHART J. F. G., BOLDINGH J., 1977. Plant lipoxygenases. *Prog. Chem. Fats Other Lipids*, **15**, 131-166.

VERHUE W. M., FRANCKE A., 1972. The heterogeneity of soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **285**, 43-53.

VIOQUE E., CALDERON M., 1967. Oxidación de triglicéridos por la lipoxidase. 1. Influencia de la pósicion del ácido linoleico. *Grasas y Aceites*, **18**, 296-302.

WALLACE J. M., WHEELER E. L., 1972. Lipoxygenase inactivation of wheat protein concentrate by heat-moisture treatments. *Cereal Chem.*, **49**, 149-156.

WALLERSTEIN J. S., HALE M. G., ALBA R. T., 1948. Oxidizing enzymes in brewing materials. 4. o-phenylenediamine oxidase in rice, wheat and corn. *Wallerstein Labs. Commun.*, **11**, 221-227.

WALSH D. E., YOUNGS V. L., GILLES K. A., 1970. Inhibition of durum wheat lipoxidase with L-ascorbic acid. *Cereal Chem.*, **47**, 119-125.

WANG C. C., GRANT D. R., 1969. The proteolytic enzymes in wheat flour. *Cereal Chem.*, **46**, 537-544.

WEAK E. D., HOSENEY R. C., SEIB P. A., BIAG M., 1977. Mixograph studies. 1. Effect of certain compounds on mixing properties. *Cereal Chem.*, **54**, 794-802.

WEBER F., LASKAWY G., GROSCH W., 1973. Enzymatischer Carotinabbau in Erbsen, Sojabohnen, Weizen und Leinsamen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **152**, 324-331.

WEBER F., LASKAWY G., GROSCH W., 1974. Cooxidation of carotene and crocin by soybean lipoxygenase isoenzymes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **155**, 142-150.

YASUMOTO K., YAMAMOTO A., MITSUDA H., 1970. Effect of phenolic antioxidants on lipoxygenase reaction. *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1162-1168.

YONEYAMA T., SUZUKI I., MUROHASHI M., 1970*a*. Natural maturing of wheat flour. 1. Changes in some chemical components and in farinograph and extensigraph properties. *Cereal Chem.*, **47**, 19-26.

YONEYAMA T., SUZUKI I., MUROHASHI M., 1970*b*. Natural maturing of wheat flour. 2. Effect of temperatures on changes in soluble SH content, and some rheological properties of doughs obtained from the flour. *Cereal Chem.*, **47**, 27-33.

ZENTNER H., 1968. Effect of ascorbic acid on wheat gluten. *J. Sci. Fd. Agric.*, **19**, 464-467.

ZIMMERMAN D. C., VICK B. A., 1970. Hydroperoxide isomerase. A new enzyme of lipid metabolism. *Plant Physiol.*, **46**, 445-453.

ZINSOU C., 1971. Dégradation enzymatique et autoxydative du β-carotène. *Physiol. Vég.*, **9**, 149-167.

ZMRHAL Z., MACHACKOVA I., 1978. Isolation and characterization of wheat peroxidase isoenzyme B1. *Phytochem.*, **17**, 1517-1520.

# TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1979

R. Alifax. — Étude de la lipolyse chez quelques levures isolées de denrées alimentaires variées . . . . . 255
S. Aubert, A. Bonnet, B. Szot. — Mise au point d'indices rhéologiques de texture en relations avec quelques caractères biochimiques de la carotte (*Daucus carota*) . . . . . 397
Michèle Ayroulet-Martin, Jeanne Fournaud. — Application de la méthode de Ling au dosage de l'acide lactique dans les viandes . . . . . 333
M. Berger, P. Grandvoinnet. — Effets de l'acide ascorbique et du chlorydrate de cystéïne sur les propriétés rhéologiques des pâtes de farine de blé appréciées à l'aide de l'alvéographe et du farinographe . . . . . 278
A. Bourdet, Renée Berrier. — L'aptitude à la panification des blés tendres appréciée par le comportement des pâtes au pétrissage . . . . . 79
J. L. Barry, Michelle Durand, J. Delort-Laval. — Influence de l'extrusion et de l'agglomération du manioc sur l'état de son amidon et sur la consommation de l'urée *in vitro* par les microorganismes du rumen . . . . . 243
A. Caulliez, Jeanne Poisson, Henriette Drouet, Marie-José Charpentié. — Stockage de haricots secs (*Phaseolus vulgaris*) : évolution de leur microflore, de leur faculté germinative et de leur qualité technologique en fonction de caractéristiques de stockage . . 57
Y. Coulibaly, S. Seck, J. Crouzet. — Évolution des constituants volatils au cours du stockage du jus de tomate. Rôle de l'acide ascorbique et des pigments caroténoïdes . . 17
Nicole Crozet, A. Guilbot. — Évolution des constituants protéiques et lipoprotéiques de l'albumen de blé en cours de maturation . . . . . 211
P. Gire, G. Monin. — Taux de glycogène musculaire, stress de transport et pH ultime de la viande chez le mouton . . . . . 433
P. Grandvoinnet, M. Berger. — Action de réducteur et d'oxydant dans les produits de cuisson à base de farine de blé . . . . . 287
V. Kovac. — Effet des moisissures du genre *Penicillium* sur l'activité laccase du *Botrytis Cinerea* . . . . . 345
J. Kopp, C. Valin. — Évolution *post mortem* des propriétés de contraction thermique du muscle de bovin . . . . . 107
J. Lefebvre, Nicole Crozet, J. Gueguen, V. Souvanavong Sihakar, L. Petit. — Étude biochimique et submicroscopique des gluténines . . . . . 153
R. Maret, T. Sozzi. — Flore malolactique de moûts et de vins du canton du Valais (Suisse). II. — Évolution des populations de lactobacilles et de pédiocoques au cours de la vinification d'un vin blanc (un Fendant) et d'un vin rouge (une Dôle) . . . . . 31
R. Maret, T. Sozzi, D. Schellenberg. — Flore malolactique de moûts et de vins du canton du Valais (Suisse). III. — Les Leuconostocs . . . . . 41
J. Mourgues. — *Mise au point bibliographique ;* Polyosides des baies de raisins . . . . 121
J. Nicolas. — *Mise au point bibliographique ;* Mise au point sur l'action d'enzymes d'oxydoréduction en technologie boulangère. La maturation des farines de blé tendre et le pétrissage des pâtes . . . . . 445
J. Pelhate, R. Thériault. — Essai de conservation des sojas humides sous atmosphères contrôlées : incidence de la mycoflore . . . . . 223
M. Renerre. — Étude comparée de la microhétérogénéité des myoglobines de porcs normaux et exsudatifs de la race Piétrain . . . . . 181
M. Renerre, P. Rougie. — Influence du chauffage sur la fixation du nitrite à la myoglobine . . . . . 423
M. Renerre, C. Valin. — Influence de l'âge sur les caractéristiques de la couleur des viandes bovines de la race limousine . . . . . 319
A. M. Riquet, Marie-Thérèse Tollier. — Constituants membranaires de pailles traitées ou non à la soude . . . . . 357
R. N. Sinha. — Ecology of microflora in stored grain (Écologie de la microflore de stockage) . . . . . 191
M. Souty, M. Buret, Camille Duby, F. Lapize, P. Ferry. — Méthode d'étude et d'utilisation d'une technique d'analyse biaisée sur analyseur automatique. — Application au dosage de l'acide galacturonique . . . . . 371

Marie-Thérèse TOLLIER, J. P. ROBIN. — Adaptation de la méthode à l'orcinol sulfurique au dosage automatique des glucides neutres totaux : conditions d'application aux extraits d'origine végétale . . . . . 1

D. TOMÉ, D. BERTRAND, G. VIROBEN, J. DELORT-LAVAL. — Tannage par le formol des aliments protéiques du ruminant. I. — Étude préliminaire du mode d'action du formol sur un substrat protéique modèle . . . . . 299

P. VAROQUAUX, F. SAUVAGEOT, M. CHAPON, P. DUPUY. — Utilisation des micro-ondes pour le blanchiment de lanières de céleri . . . . . 387

*Chronique des livres* . . . . . 151

## CONTENTS OF YEAR 1979

R. Alifax. — Study of some lipolytic yeasts . . . . . 255
S. Aubert, A. Bonnet, B. Szot. — Texture and quality of carrot . . . . . 397
Michèle Ayroulet-Martin, Jeanne Fournaud. — Ling's method application to the lactic acid titration in meat . . . . . 333
J. L. Barry, Michelle Durand, J. Delort-Laval. — Effect of extrusion and pelleting on cassava starch degradability and *in vitro* urea utilization by rumen microorganisms . 243
M. Berger, P. Grandvoinnet. — Appreciation of ascorbic acid and cysteine chlorydrate effects on the rheological properties of wheat flour doughs with the alveograph and the farinograph . . . . . 273
A. Bourdet, Renée Berrier. — The baking value of wheats as appreciated by the mixing behaviour of doughs . . . . . 79
A. Caulliez, Jeanne Poisson, Henriette Drouet, Marie-José Charpentié. — Storage of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) : Evolution of their microflora, of their germinative power and their technological quality in relation with storage characteristics . . . . . 57
Y. Coulibaly, S. Seck, J. Crouzet. — Changes of tomato juice volatile components during storage. Role of ascorbic acid and carotenoid pigments . . . . . 17
Nicole Crozet, A. Guilbot. — Evolution of protein and lipoprotein components during the maturation of wheat endosperm . . . . . 211
P. Gire, G. Monin. — Muscle glycogen level, transport stress and ultimate pH of mutton 433
P. Grandvoinnet, M. Berger. — Effects of reducing agent and oxydant on bakery products . . . . . 287
J. Koop, C. Valin. — Thermally induced contraction in bovine muscle as affected by *post mortem* time course . . . . . 107
V. Kovac. — Influence of *Penicillium* on the production of Laccase by *Botrytis cinerea* . . 345
J. Lefebvre, Nicole Crozet, J. Gueguen, V. Souvanavong Sihakar, L. Petit. Biochemical and submicroscopic characterization of glutenins . . . . . 153
R. Maret, T. Sozzi. — Malolactic flora of musts and wines from the canton of Valais (Switzerland). II. — Population and evolution of lactobacilli and pediococci during the wine making process of Fendant (white wine) and of Dôle (red wine) . . . . . 31
R. Maret, T. Sozzi, D. Schellenberg. — Malolactic flora of musts and wines from the Canton of Valais (Switzerland). III. — The Leuconostoc . . . . . 41
J. Mourgues. — *Monograph :* Grape berries polysaccharides. . . . . 121
J. Nicolas. — *Monograph :* Review on effects of some oxidoreduction enzymes in breadmaking. Flour maturation and dough mixing . . . . . 445
J. Pelhate, R. Theriault. — Preservation test of high moisture soybean grains in controlled atmospheres . . . . . 223
M. Renerre. — Comparative study of the microheterogeneity of myoglobin from normal and P.S.E. pietrain pigs . . . . . 181
M. Renerre, P. Rougie. — Influence of heating on the nitrite fixation on myoglobin . . 423
M. Renerre, C. Valin. — Influence of age on color characteristics of young bulls meat (Limousin Breed) . . . . . 319
A. M. Riquet, Marie-Thérèse Tollier. — Polysaccharides of cereal straws treated by NaOH . . . . . 357
R. N. Sinha. — Ecology of microflora in stored grain . . . . . 191
M. Souty, M. Buret, Camille Duby, F. Lapize, P. Ferry. — Study and use of an automated colorimetric method which gives systematic errors. — Application to the galacturonic acid determination . . . . . 371
Marie-Thérèse Tollier, J.-P. Robin. — Adaptation of the orcinol-sulphuric acid method for the automatic titration of total neutral sugars : conditions of application to plant extracts . . . . . 1
D. Tome, D. Bertrand, G. Viroben, J. Delort-Laval. — Formaldehyde treatment of dietary proteins for ruminants. I. — Preliminary study of the action of formaldehyde on a casein substrate . . . . . 299
P. Varoquaux, F. Sauvageot, M. Chapon, P. Dupuy. — Microwave blanching of strips of celery tissue . . . . . 387
*Book review* . . . . . 151